

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/002457

International filing date: 04 March 2005 (04.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: US
Number: 60/550,021
Filing date: 05 March 2004 (05.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 23 March 2005 (23.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

04.03.05

EP05/02457

PA 1264714

THE UNITED STATES OF AMERICA**TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:****UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE****United States Patent and Trademark Office****December 28, 2004**

**THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM
THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK
OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT
APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A
FILING DATE UNDER 35 USC 111.**

APPLICATION NUMBER: 60/550,021

FILING DATE: March 05, 2004



**By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS**

Trudie Wallace
TRUDIE WALLACE

Certifying Officer

Attorney Docket Number: 65084.000003

Please type a plus sign (+) inside this box →

+

PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT COVER SHEET

MAIL STOP PROVISIONAL PATENT APPLICATION

COMMISSIONER OF PATENTS

P.O. Box 1450

ALEXANDRIA, VA 22313-1450

THIS IS A REQUEST FOR FILING A PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT UNDER 37 C.F.R. § 1.53(c).

INVENTOR(S)/APPLICANT(S)

Given Name (first and middle (if any))	Family Name or Surname	Residence (City and Either State or Foreign Country)
Claus	FROHBERG	Kleinmachnow, Germany
Oliver	KOETTING	Berlin, Germany
Gerhard	RITTE	Postdam, Germany
Martin	STEUP	Berlin, Germany

Additional inventors are being named on page 2 attached hereto.

TITLE OF THE INVENTION (280 characters max)**PLANTS WITH INCREASED ACTIVITY OF SEVERAL STRENGTH PHOSPHORYLIERENDER ENZYMES****CORRESPONDENCE ADDRESS**

Please Direct All Correspondence To:

<input checked="" type="checkbox"/> Customer No.	21967				
<input type="checkbox"/> Firm Name	Hunton & Williams LLP				
Attorney of Record	Robert M. Schulman, Esq.				
Address	Intellectual Property Department				
	1900 K Street, N.W., Suite 1200				
City	Washington	State	DC	Zip Code	20006-1109
Country	U.S.A.	Telephone	202-955-1500	Facsimile	202-778-2201

ENCLOSED APPLICATION PARTS (check all that apply)

<input checked="" type="checkbox"/> Specification	Number of Pages	224	<input type="checkbox"/> Small Entity Status Claimed As:
<input checked="" type="checkbox"/> Drawing(s)	Number of Sheets	5	<input type="checkbox"/> Other (specify) _____

METHOD OF PAYMENT OF FILING FEE FOR THIS PROVISIONAL APPLICATION

A check in the amount of ☒ \$160.00 ☐ \$80.00 is enclosed to cover the filing fee. The Commissioner is hereby authorized to charge any variance between the amount enclosed and the Patent Office charges to **Deposit Account No. 50-0206**

☒ The Commissioner is hereby authorized to charge the \$ _____ filing fee or credit any overpayment to **Deposit Account No. 50-0206**.

The invention was made by an agency of the United States Government or under a contract with an agency of the United States Government.

☒ No.
☐ Yes, the name of the U.S. Government agency and the Government contract number are: _____

Respectfully submitted,

By

Jeffrey T. Perez

Date

March 5, 2004

Telephone

(202) 955-1902

Registration No.

52,110



13281 U.S. PTO

FEE TRANSMITTAL

MAIL STOP Provisional Patent
Application

Complete If Known

Application No.	Not yet assigned
Filing Date	March 5, 2004
First Named Inventor	FROHBERG, et al.
Examiner Name	Not yet assigned
Group Art Unit	Unknown
Attorney Docket No.	65084.000003

Total Amount Of Payment (\$)**160**

METHOD OF PAYMENT (check one)

1. ☒ The Commissioner for Patents is hereby authorized to charge indicated fees and credit any over payments to **Deposit Account No. 50-0206** in the name of Hunton & Williams LLP.2. ☒ Check Enclosed. The Commissioner for Patents is hereby authorized to charge any variance between the amount enclosed and the Patent Office charges to **Deposit Account No. 50-0206** in the name of Hunton & Williams LLP, 1900 K Street, N.W., Suite 1200, Washington, D.C. 20006-1109.

FEE CALCULATION

1. **BASIC FILING FEE** ☒ Large Entity ☐ Small Entity

FEE PAID

Utility Filing Fee	\$
Design Filing Fee	\$
Plant Filing Fee	\$
Reissue Filing Fee	\$
Provisional Filing Fee	\$ 160.00

FEE CALCULATION (continued)

3. **ADDITIONAL FEES**

Fee Description	Fee Paid
<input type="checkbox"/> Surcharge - late filing fee or oath	\$
<input type="checkbox"/> Surcharge - late provisional filing fee or cover sheet	\$
<input type="checkbox"/> _____ Month Extension of Time	\$
<input type="checkbox"/> Notice of Appeal	\$
<input type="checkbox"/> Filing Brief in Support of Appeal	\$
<input type="checkbox"/> Request for Oral Hearing	\$
<input type="checkbox"/> Utility Issue Fee (or Reissue) (including Publication Fee, if necessary)	\$
<input type="checkbox"/> Design Issue Fee	\$
<input type="checkbox"/> Plant Issue Fee	\$
<input type="checkbox"/> Petition to Commissioner	\$
<input type="checkbox"/> Petition to Revive (Unavoidable)	\$
<input type="checkbox"/> Petition to Revive (Unintentional)	\$
<input type="checkbox"/> Petitions Related to Provisional Applications	\$
<input type="checkbox"/> Submission of Information Disclosure Statement	\$
<input type="checkbox"/> Filing Submission After Final Rejection	\$
<input type="checkbox"/> Recording Each Patent Assignment Per Property	\$
<input type="checkbox"/> Filing Request for Reexamination	\$
<input type="checkbox"/> Other (specify) _____	\$

2. **EXTRA CLAIMS FEES**

CLAIMS AS AMENDED

For	Number Present	Highest Number Paid For	Extra	Rate		Amount
				Large Entity	Small Entity	
TOTAL CLAIMS		20	0	x \$ 18.00	x \$ 9.00	\$ 0.00
INDEPENDENT CLAIMS		3	0	x \$ 86.00	x \$ 43.00	\$ 0.00
MULTIPLE DEPENDENT CLAIMS				\$ 290.00	\$ 145.00	\$ 0.00
TOTAL EXTRA CLAIMS FEES						\$ 0.00

SUBMITTED BY

Complete (if applicable)

Typed or Printed Name Jeffrey T. Perez

Registration No. 52,110

Signature

Date

March 5, 2004

Bayer CropScience GmbH

Pflanzen mit erhöhter Aktivität mehrerer Stärke phosphorylierender

5 Enzyme

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Pflanzenzellen und Pflanzen, die genetisch modifiziert sind, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der Aktivität eines Stärke phosphorylierenden OK1 Proteins und eines Stärke phosphorylierenden R1
10 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen führt. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Mittel und Verfahren zur Herstellung solcher Pflanzenzellen und Pflanzen. Derartige Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren eine modifizierte Stärke. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch die von den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und
15 Pflanzen synthetisierte Stärke, Verfahren zur Herstellung dieser Stärke, sowie die Herstellung von Stärkederivaten dieser modifizierten Stärke, als auch Mehle, enthaltend erfindungsgemäße Stärken.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung, Nucleinsäuremoleküle und Vektoren, enthaltend Sequenzen, die für ein OK1 Protein und ein R1 Protein codieren, sowie
20 Wirtszellen, die diese Nucleinsäuremoleküle enthalten.

Im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung, die pflanzlichen Inhaltsstoffen als erneuerbaren Rohstoffquellen zur Zeit beigemessen wird, ist es eine der Aufgaben der biotechnologischen Forschung, sich um eine Anpassung dieser pflanzlichen
25 Rohstoffe an die Anforderungen der verarbeitenden Industrie zu bemühen. Um eine Anwendung von nachwachsenden Rohstoffen in möglichst vielen Einsatzgebieten zu ermöglichen, ist es darüber hinaus erforderlich, eine große Stoffvielfalt zu erreichen.

Das Polysaccharid Stärke ist aus chemisch einheitlichen Grundbausteinen, den
30 Glucosemolekülen, aufgebaut, stellt jedoch ein komplexes Gemisch unterschiedlicher Molekülformen dar, die Unterschiede hinsichtlich des

Polymerisations- und des Verzweigungsgrades aufweisen und sich somit in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften stark voneinander unterscheiden. Man differenziert zwischen Amylosestärke, einem im Wesentlichen unverzweigten Polymer aus alpha-1,4-glycosidisch verknüpften Glucoseeinheiten, und der
5 Amylopektinstärke, einem verzweigten Polymer, bei dem die Verzweigungen durch das Auftreten zusätzlicher alpha-1,6-glycosidischer Verknüpfungen zustande kommen. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen Amylose und Amylopektin liegt im Molekulargewicht. Während Amylose, je nach Herkunft der Stärke, ein Molekulargewicht von $5 \times 10^5 - 10^6$ Da besitzt, liegt das des Amylopektins zwischen
10 10^7 und 10^8 Da. Die beiden Makromoleküle können durch ihr Molekulargewicht und ihre unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften differenziert werden, was am einfachsten durch ihre unterschiedlichen Jodbindungseigenschaften sichtbar gemacht werden kann.

Amylose wurde lange als lineares Polymer, bestehend aus alpha-1,4-glycosidisch
15 verknüpften alpha-D-Glucose-Monomeren, angesehen. In neueren Studien wurde jedoch die Anwesenheit von alpha-1,6-glycosidischen Verzweigungspunkten (ca. 0,1%) nachgewiesen (Hizukuri und Takagi, Carbohydr. Res. 134, (1984), 1-10; Takeda et al., Carbohydr. Res. 132, (1984), 83-92).

20 Die funktionellen Eigenschaften, wie z.B. die Löslichkeit, das Retrogradationsverhalten, das Wasserbindevermögen, die Filmbildungseigenschaften, die Viskosität, die Verkleisterungseigenschaften, die Gefrier-Tau-Stabilität, die Säurestabilität, die Gelfestigkeit, die Stärkekorngröße von Stärken werden u.a. durch das Amylose/Amylopektin-Verhältnis, das
25 Molekulargewicht, das Muster der Seitenkettenverteilung, den Gehalt an Ionen, den Lipid- und Proteingehalt, die mittlere Stärkekorngröße die Stärkekornmorphologie etc. beeinflusst. Die funktionellen Eigenschaften von Stärke werden auch vom Phosphatgehalt, einer nicht-Kohlenstoffkomponente von Stärke, beeinflusst. Dabei ist zwischen Phosphat, welches in Form von Monoestern kovalent an die
30 Glucosemoleküle der Stärke gebundenen ist (im Folgenden als Stärkephosphat bezeichnet) und Phosphat in Form von mit der Stärke assoziierten Phospholipiden zu unterscheiden.

Der Gehalt an Stärkephosphat variiert je nach Pflanzensorte. So synthetisieren z.B. bestimmte Maismutanten eine Stärke mit erhöhtem Gehalt an Stärkephosphat (waxy-Mais 0,002% und Hoch-Amylose-Mais 0,013%), während herkömmliche Mais Sorten
5 nur Spuren von Stärkephosphat aufweisen. Ebenfalls geringe Mengen an Stärkephosphat findet man in Weizen (0,001%) während in Hafer und Sorghum kein Stärkephosphat nachgewiesen werden konnte. In Reis-Mutanten wurde ebenfalls weniger Stärkephosphat gefunden (waxy-Reis 0,003%), als in herkömmlichen Reissorten (0,013%). Signifikante Mengen von Stärkephosphat wurden in Knollen-
10 oder Wurzelspeichestärke synthetisierenden Pflanzen wie z.B. Tapioca (0,008%), Süßkartoffel (0,011%), Pfeilwurz (0,021%) oder Kartoffel (0,089%) nachgewiesen. Die im Vorangegangenen zitierten prozentualen Werte für den Stärkephosphatgehalt beziehen sich jeweils auf das Trockengewicht der Stärke und sind von Jane et al. (1996, Cereal Foods World 41 (11), 827-832) ermittelt worden.

15

Stärkephosphat kann in Form von Monoestern an der C-2, C-3 oder C-6 Position der polymerisierten Glucosemonomere vorliegen (Takeda und Hizukuri, 1971, Starch/Stärke 23, 267-272). Die Phosphatverteilung des Phosphates in von Pflanzen synthetisierter Stärke zeichnet sich im Allgemeinen dadurch aus, dass etwa 30% bis
20 40% der Phosphatreste in C-3-Position und etwa 60% bis 70% der Phosphatreste in C-6-Position der Glucosemoleküle kovalent gebunden sind (Blennow et al., 2000, Int. J. of Biological Macromolecules 27, 211-218). Blennow et al. (2000, Carbohydrate Polymers 41, 163-174) ermittelten einen Gehalt an Stärkephosphat, der in C-6 Position der Glukosemoleküle gebunden ist, für verschiedene Stärken, wie z.B.
25 Kartoffelstärke (zwischen 7,8 und 33,5 nMol pro mg Stärke, je nach Sorte), Stärke aus verschiedenen *Curcuma* Spezies (zwischen 1,8 und 63 nMol pro mg), Tapiocastärke (2,5 nMol pro mg Stärke), Reisstärke (1,0 nMol pro mg Stärke), Mungbohnenstärke (3,5 nMol pro mg Stärke) und Sorghumstärke (0,9 nMol pro mg Stärke). In Gerstenstärke und Stärke aus verschiedenen waxy-Mutanten von Mais
30 konnten diese Autoren kein an der C-6-Position gebundenes Stärkephosphat nachweisen. Bisher konnte kein Zusammenhang zwischen dem Genotyp einer Pflanze und dem Gehalt von Stärkephosphat hergestellt werden (Jane et al., 1996,

Cereal Foods World 41 (11), 827-832). Daher ist es zurzeit nicht möglich, den Gehalt an Stärkephosphat in Pflanzen durch züchterische Maßnahmen zu beeinflussen.

Bisher ist nur ein Protein beschrieben, welches die Einführung von kovalenten Bindungen von Phosphatresten an die Glucosemoleküle der Stärke vermittelt. Dieses Protein besitzt die enzymatische Aktivität einer alpha-Glucan-Wasser-Dikinase (GWD, E.C.: 2.7.9.4) (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171), wird in der wissenschaftlichen Literatur häufig als R1 bezeichnet und ist an die Stärkekörner der Speicherstärke in Kartoffelknollen gebunden (Lorberth et al., 1998, Nature Biotechnology 16, 473-477). In der von R1 katalysierten Reaktion werden die Edukte alpha-1,4-Glucan (Stärke), Adenosintriphosphat (ATP) und Wasser zu den Produkten Glucan-Phosphat (Stärkephosphat), Monophosphat und Adenosinmonophosphat umgesetzt. Dabei wird der gamma-Phosphatrest des ATP auf Wasser und der beta-Phosphatrest des ATP auf das Glucan (Stärke) übertragen. R1 überträgt *in vitro* den beta-Phosphatrest von ATP auf die C-6- und die C-3-Position der Glucosemoleküle von alpha-1,4-Glucanen. Das Verhältnis von C-6-Phosphat zu C-3 Phosphat, welches bei der *in vitro* Reaktion erhalten wird, entspricht dem Verhältnis, welches in Stärke, isoliert aus Pflanzen, vorliegt (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171). Da das Stärkephosphat in Kartoffelstärke zu etwa 70% in C-6-Position und zu etwa 30% in C-3-Position der Glucosemonomere der Stärke gebunden vorliegt, bedeutet dies, dass R1 bevorzugt die C-6-Position der Glucosemoleküle phosphoryliert. Weiterhin ist für R1 u.a. durch Verwendung von Amylopektin aus Mais gezeigt worden, dass es alpha-1,4-Glucane phosphorylieren kann, welche noch kein kovalent gebundenes Phosphat enthalten (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171), d.h. R1 ist in der Lage, Phosphat *de novo* in alpha-1,4-Glucane einführen.

Weizenpflanzen, welche durch Überexpression eines R1 Gens aus Kartoffel eine erhöhte Aktivität eines R1 Proteins aufweisen, sind in WO 02 34923 beschrieben. Diese Pflanzen synthetisieren im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen, in welchen kein Stärkephosphat detektiert werden konnte, eine Stärke mit signifikanten Mengen an Stärkephosphat in der C-6-Position der Glucosemoleküle.

Weitere Proteine, die eine Reaktion katalysieren, welche kovalent gebundene Phosphatgruppen in die Stärke einführen, sind bisher nicht beschrieben. Auch Enzyme, die bevorzugt Phosphatgruppen in C-3-Position und/oder C-2-Position der
5 Glucosemoleküle von Stärke einführen, sind nicht bekannt. Damit stehen abgesehen von der Erhöhung des Gehaltes an Stärkephosphat in Pflanzen auch keine Möglichkeiten zur Verfügung, die Phosphorylierung von Stärke in Pflanzen gezielt zu beeinflussen, die Phosphatverteilung innerhalb der von Pflanzen synthetisierten Stärke zu verändern und/oder den Gehalt an Stärkephosphat weiter zu erhöhen.

10

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zu Grunde, modifizierte Stärken mit erhöhtem Phosphatgehalt und/oder veränderter Phosphatverteilung sowie Pflanzenzellen und/oder Pflanzen, die eine solche modifizierte Stärke synthetisieren, als auch Verfahren und Mittel zur Erzeugung besagter Pflanzen und/oder
15 Pflanzenzellen zur Verfügung zu stellen.

Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

20 Somit betrifft die vorliegende Erfindung genetisch modifizierte Pflanzenzellen und Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine erhöhte Aktivität mindestens eines OK1 Proteins und mindestens eines R1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen aufweisen.

25

Ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine Pflanzenzelle oder eine Pflanze, die genetisch modifiziert ist, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins und gleichzeitig mindestens eines R1 Proteins führt, im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-
30 Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen.

Die genetische Modifikation kann dabei jede genetische Modifikation sein, die zu einer Erhöhung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins und (gleichzeitig) mindestens eines R1 Proteins in genetisch modifizierten Pflanzenzellen oder genetisch modifizierten Pflanzen führt im Vergleich zu entsprechenden nicht
5 genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen oder Wildtyp-Pflanzen.

Der Begriff „Wildtyp-Pflanzenzelle“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass es sich um Pflanzenzellen handelt, die als Ausgangsmaterial für die Herstellung der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen dienen, d.h. deren genetische
10 Information, abgesehen von der eingeführten genetischen Modifikation, der einer erfindungsgemäßen Pflanzenzelle entspricht.

Der Begriff „Wildtyp-Pflanze“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass es sich um Pflanzen handelt, die als Ausgangsmaterial für die
15 Herstellung der erfindungsgemäßen Pflanzen dienen, d.h. deren genetische Information, abgesehen von der eingeführten genetischen Modifikation, der einer erfindungsgemäßen Pflanze entspricht.

Der Begriff „entsprechend“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden
20 Erfindung, dass beim Vergleich von mehreren Gegenständen die betreffenden Gegenstände, die miteinander verglichen werden, unter gleichen Bedingungen gehalten wurden. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bedeutet der Begriff „entsprechend“ im Zusammenhang mit Wildtyp-Pflanzenzelle oder Wildtyp-Pflanze, dass die Pflanzenzellen oder Pflanzen, die miteinander verglichen werden,
25 unter gleichen Kulturbedingungen aufgezogen wurden und dass sie ein gleiches (Kultur-) Alter aufweisen.

Der Begriff "erhöhte Aktivität mindestens eines OK1 Proteins" bedeutet dabei im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Erhöhung der Expression endogener
30 Gene, die OK1 Proteine codieren und/oder eine Erhöhung der Menge an OK1 Protein in den Zellen und/oder eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität von OK1 Proteinen in den Zellen.

Der Begriff "erhöhte Aktivität mindestens eines R1 Proteins" bedeutet dabei im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Erhöhung der Expression endogener Gene, die R1 Proteine codieren und/oder eine Erhöhung der Menge an R1 Protein in
5 den Zellen und/oder eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität von R1 Proteinen in den Zellen.

Die Erhöhung der Expression kann beispielsweise bestimmt werden durch Messung der Menge an Transkripten, die OK1 Proteine oder R1 Proteine codieren. Dieses
10 kann z.B. durch Northern-Blot-Analyse oder RT-PCR erfolgen. Eine Erhöhung bedeutet dabei vorzugsweise eine Erhöhung der Menge an Transkripten im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Zellen um mindestens 50%, insbesondere um mindestens 70%, bevorzugt um mindestens 85% und besonders bevorzugt um mindestens 100%. Eine Erhöhung der Menge an
15 Transkripten, codierend ein OK1 Protein, bedeutet auch, dass Pflanzen oder Pflanzenzellen, die keine nachweisbaren Mengen an Transkripten, codierend ein OK1 Protein aufweisen, nach erfindungsgemäßer genetischer Modifikation nachweisbare Mengen an Transkripten, codierend ein OK1 Protein aufweisen. Eine Erhöhung der Menge an Transkripten, codierend ein R1 Protein, bedeutet auch, dass
20 Pflanzen oder Pflanzenzellen, die keine nachweisbaren Mengen an Transkripten, codierend ein R1 Protein, aufweisen, nach erfindungsgemäßer genetischer Modifikation nachweisbare Mengen an Transkripten, codierend ein R1 Protein, aufweisen.

25 Die Erhöhung der Menge an Protein eines OK1 Proteins oder eines R1 Proteins, die eine erhöhte Aktivität dieser Proteine in den betreffenden Pflanzenzellen zur Folge hat, kann beispielsweise bestimmt werden durch immunologische Methoden wie Western-Blot-Analyse, ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) oder RIA (Radio Immune Assay). Eine Erhöhung bedeutet dabei vorzugsweise eine Erhöhung
30 der Menge Protein im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Zellen um mindestens 50%, insbesondere um mindestens 70%, bevorzugt um mindestens 85% und besonders bevorzugt um mindestens 100%. Eine Erhöhung der

Menge an OK1 Protein bedeutet auch, dass Pflanzen oder Pflanzenzellen, die keine nachweisbare Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen, nach erfindungsgemäßer genetischer Modifikation eine nachweisbare Menge eines OK1 Proteins aufweisen. Eine Erhöhung der Menge an R1 Protein bedeutet auch, dass Pflanzen oder
5 Pflanzenzellen, die keine nachweisbare Aktivität eines R1 Proteins aufweisen, nach erfindungsgemäßer genetischer Modifikation eine nachweisbare Menge eines R1 Proteins aufweisen.

Methoden zur Herstellung von Antikörpern, die spezifisch mit einem bestimmten
10 Protein reagieren, d.h. die spezifisch an besagtes Protein binden, sind dem Fachmann bekannt (siehe z.B. Lottspeich und Zorbas (Eds.), 1998, Bioanalytik, Spektrum akad, Verlag, Heidelberg, Berlin, ISBN 3-8274-0041-4). Die Herstellung solcher Antikörper wird von einigen Firmen (z.B. Eurogentec, Belgien) als Auftragservice angeboten. Eine Möglichkeit zur Herstellung von Antikörpern, die mit
15 einem OK1 Protein spezifisch reagieren, ist weiter unten beschrieben (siehe Beispiel 10). Ein Antikörper, mit welchem eine Erhöhung der Menge an R1 Protein mittels immunologischer Methoden festgestellt werden kann, ist bei Lorberth et al. (1998, Nature Biotechnology 16, 473-477) und Ritte et al. (2000, Plant Journal 21, 387-391) beschrieben.

20

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung soll unter dem Begriff „OK 1 Protein“ ein Protein verstanden werden, welches einen Phosphatrest von ATP auf bereits phosphorylierte Stärke (P-Stärke) überträgt. Stärken, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante weisen keine nachweisbaren Mengen an
25 kovalent gebundenen Phosphatresten auf und werden von einem OK1 Protein nicht phosphoryliert, d.h. ein erfindungsgemäßes OK1 Protein benötigt bereits phosphorylierte Stärke als Substrat zur Übertragung weiterer Phosphatreste. Bevorzugt wird von einem OK1 Protein der beta-Phosphatrest des ATP auf die Stärke und der gamma-Phosphatrest des ATP auf Wasser übertragen. Als weiteres
30 Reaktionsprodukt entsteht bei einer durch ein OK1 Protein durchgeführten Phosphorylierungsreaktion von P-Stärke AMP (Adenosinmonophosphat). Ein Ok1

- Protein wird daher als [phosphoryliertes-alpha-Glucan]-Wasser-Dikinase ([P-Glucan]-Wasser-Dikinase) bzw. als [phosphorylierte-Stärke]-Wasser-Dikinase bezeichnet.
- Bevorzugt entsteht an der durch ein OK1 Protein phosphorylierten P-Stärke eine zusätzliche Phosphatmonoesterbindung in C-6-Position und/oder in C-3-Position
- 5 eines Glucosemoleküls der P-Stärke. Besonders bevorzugt entstehen bei der durch ein OK1 Protein katalysierten Phosphorylierung von P-Stärke mehr zusätzliche Phosphatmonoesterbindungen in C-3-Position im Vergleich zu Phosphatmonoesterbindungen in C-6-Position der Glucosemoleküle der betreffenden P-Stärke.
- 10 Aminosäuresequenzen, die OK1 Proteine codieren, enthalten eine Phosphohistidindomäne. Phosphohistidindomänen sind z.B. beschrieben bei Tien-Shin Yu et al. (2001, Plant Cell 13, 1907-1918). Bevorzugt enthalten Phosphohistidindomänen von OK1 Proteine codierenden Aminosäuresequenzen zwei Histidine.
- 15 Bei der Katalyse einer Phosphorylierungsreaktion einer P-Stärke durch ein OK1 Protein entsteht als Zwischenprodukt ein phosphoryliertes OK1 Protein, bei welchem ein Phosphatrest des ATP kovalent an eine Aminosäure des OK1 Proteins gebunden ist. Das Zwischenprodukt entsteht durch Autophosphorylierung des OK1 Proteins, d.h. das OK1 Protein selbst katalysiert die Reaktion, die zu dem Zwischenprodukt
- 20 führt. Bevorzugt wird durch die Autophosphorylierung ein Histidinrest der Aminosäuresequenz, codierend ein OK1 Protein, phosphoryliert, besonders bevorzugt ein Histidinrest, der Bestandteil einer Phosphohistidindomäne ist.
- Weiterhin weisen erfindungsgemäße OK1 Proteine eine erhöhte Bindungsaktivität zu P-Stärke auf im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke.
- 25
- Da bisher keine Enzyme beschrieben sind, die P-Stärke als Substrat benötigen, um diese weiter zu phosphorylieren, war es bisher auch nicht möglich, den Gehalt an Stärkephosphat von bereits phosphorylierter-Stärke in Pflanzen über ein gewisses Maß hinaus zu steigern. Dieses ist nun durch Verwendung eines erfindungsgemäßen
- 30 Proteins oder eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls zur genetischen Modifikation von Pflanzen möglich. Die Aufklärung der Funktion eines OK1 Proteins und damit die Bereitstellung eines OK1 Proteins führt dazu, dass nun Pflanzen

dahingehend genetisch modifiziert werden können, dass sie eine Stärke mit veränderten Eigenschaften synthetisieren. Das Verändern der Phosphatverteilung in von Pflanzen synthetisierter Stärke war aus Mangel an zur Verfügung stehenden Mitteln bisher nicht möglich. Durch die Bereitstellung erfindungsgemäßer Proteine und Nucleinsäuren durch die vorliegende Erfindung ist nun auch eine Veränderung des Phosphatverhältnisses in nativen Stärken möglich.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung soll unter dem Begriff „R1 Protein“ ein Protein verstanden werden, welches einen Phosphatrest von ATP auf Stärke überträgt. Stärken, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante weisen keine nachweisbaren Mengen an kovalent gebundenen Phosphatresten auf werden jedoch von einem R1 Protein phosphoryliert. D.h. nicht-phosphorylierte-Stärke, z.B. isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante wird in einer durch ein R1 Protein katalysierten Phosphorylierungsreaktion als Substrat verwendet.

Bevorzugt wird von einem R1 Protein der beta-Phosphatrest des ATP auf die Stärke und der gamma-Phosphatrest des ATP auf Wasser übertragen. Als weiteres Reaktionsprodukt entsteht AMP (Adenosinmonophosphat). Ein R1 Protein wird daher als [alpha-1,4-Glucan]-Wasser-Dikinase bzw. als Stärke- Wasser-Dikinase bezeichnet (E.C.: 2.7.9.4; Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171).

Bei der durch ein R1 Protein katalysierten Phosphorylierung von Stärke entstehen mehr zusätzliche Phosphatmonoesterbindungen in C-6-Position im Vergleich zu Phosphatmonoesterbindungen in C-3-Position der Glucosemoleküle der betreffenden Stärke. Von einem R1 Protein werden ca. 60% bis 70% der Phosphatreste in C-6-Position und ca. 30% bis 40% der Phosphatreste in C-3-Position der Glucosemoleküle von Stärke eingeführt (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171).

Bei der Katalyse einer Phosphorylierungsreaktion einer Stärke durch ein R1 Protein entsteht als Zwischenprodukt ein phosphoryliertes R1 Protein, bei welchem ein Phosphatrest des ATP kovalent an eine Aminosäure des R1 Proteins gebunden ist (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171). Das Zwischenprodukt entsteht durch Autophosphorylierung des R1 Proteins, d.h. das R1 Protein selbst katalysiert die

- Reaktion, die zu dem Zwischenprodukt führt. Aminosäuresequenzen, die OK1 Proteine codieren, enthalten eine Phosphohistidindomäne. Phosphohistidindomänen sind z.B. beschrieben bei Tien-Shin Yu et al. (2001, Plant Cell 13, 1907-1918). Bevorzugt enthalten Phosphohistidindomänen von R1 Proteine codierenden
- 5 Aminosäuresequenzen ein Histidin. Durch die Autophosphorylierung eines R1 Proteins wird ein Histidinrest in einer Phosphohistidindomäne der Aminosäuresequenz, codierend ein R1 Protein, phosphoryliert (Mikkelsen et al., 2003, Biochemical Journal Intermediate Publication. Published on October 2003 as manuscript BJ20030999).
- 10 Nukleinsäuresequenzen und zu diesen korrespondierende Aminosäuresequenzen, codierend ein R1 Protein sind aus unterschiedlichen Spezies, wie z.B. Kartoffel (WO 97 11188, GenBank Acc.: AY027522, Y09533), Weizen (WO 00 77229, US 6,462,256, GenBank Acc.: AAN93923, GenBank Acc.: AR236165), Reis (GenBank Acc.: AAR61445, GenBank Acc.: AR400814), Mais (GenBank Acc.: AAR61444,
- 15 GenBank Acc.: AR400813), Soyabohne (GenBank Acc.: AAR61446, GenBank Acc.: AR400815), Citrus (GenBank Acc.: AY094062) und *Arabidopsis* (GenBank Acc.: AF312027) beschrieben. Die genannten Nukleinsäuresequenzen und Aminosäuresequenzen codierend R1 Proteine sind u.a. veröffentlicht vom NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>) und sind durch Nennung der Referenzen
- 20 ausdrücklich in die Beschreibung der vorliegenden Anmeldung aufgenommen.

Unter dem Begriff „erhöhte Bindungsaktivität“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, eine erhöhte Affinität eines Proteins zu einem ersten Substrat im Vergleich zu einem zweiten Substrat verstanden werden. D.h., dass die

25 Menge an Protein, die unter gleichen Inkubationsbedingungen vermehrt an ein erstes Substrat im Vergleich zu einem zweiten Substrat bindet, eine erhöhte Bindungsaktivität zu dem ersten Substrat aufweist.

Unter dem Begriff „Stärkephosphat“ sollen im Zusammenhang mit der vorliegenden

30 Erfindung kovalent an die Glucosemoleküle von Stärke gebundene Phosphatgruppen verstanden werden.

Unter dem Begriff „nicht-phosphorylierte-Stärke“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Stärke verstanden werden, welche keine nachweisbaren Mengen an Stärkephosphat enthält. Zur Bestimmung der Menge an Stärkephosphat sind verschiedene Methoden beschrieben. Bevorzugt kann die bei Ritte et al. (2000, 5 Starch/Stärke 52, 179-185) beschriebene Methode zur Bestimmung der Menge von Stärkephosphat verwendet werden. Besonders bevorzugt wird die Bestimmung der Menge an Stärkephosphat mittels ^{31}P -NMR nach der bei Kasemusuwan und Jane (1996, Cereal Chemistry 73, 702-707) beschriebenen Methode durchgeführt.

10 Unter dem Begriff „phosphorylierte-Stärke“ oder „P-Stärke“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Stärke verstanden werden, welche Stärkephosphat enthält.

Nachgewiesen werden kann die Aktivität eines OK1 Proteins z.B. durch *in vitro* 15 Inkubation eines OK1 Proteins unter Verwendung von ATP, welches einen in der beta-Position markierten Phosphatrest enthält (markiertes ATP). Zu bevorzugen ist ATP, bei welchem der Phosphatrest in beta-Position spezifisch markiert ist, d.h. bei welchem nur der Phosphatrest in beta-Position eine Markierung trägt. Bevorzugt wird radioaktiv markiertes ATP, besonders bevorzugt ATP, bei welchem der Phosphatrest 20 in beta-Position spezifisch radioaktiv markiert ist und insbesondere bevorzugt wird ATP, bei welchem der Phosphatrest in beta-Position spezifisch mit ^{33}P markiert ist, verwendet. Wird ein OK1 Protein mit markiertem ATP und Stärken, welche nicht phosphoryliert sind, inkubiert, wird kein Phosphat durch OK1 auf die Stärke übertragen. Bevorzugt wird Blattstärke der *Arabidopsis thaliana* Mutante *sex1-3* 25 (Tien-Shin Yu et al., 2001, Plant Cell 13, 1907-1918) verwendet.

Wird ein OK1 Protein hingegen mit P-Stärke in Gegenwart von markiertem ATP inkubiert, so kann anschließend kovalent an die P-Stärke gebundenes markiertes Phosphat nachgewiesen werden. Bevorzugt wird Stärke aus Blättern von *Arabidopsis thaliana*, besonders bevorzugt mittels eines R1 Proteins enzymatisch 30 phosphorylierte Stärke aus *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutanten (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171) verwendet.

Nachgewiesen werden können markierte Phosphatreste, die durch ein OK1 Protein in P-Stärke eingebaut wurden z.B. durch Abtrennung der markierten P-Stärke (z.B. durch Ausfällen mittels Ethanol, Filtration, chromatographische Methoden etc.) vom Rest des Reaktionsgemisches und anschließender Detektion der markierten

5 Phosphatreste in der P-Stärke Fraktion. Die in der P-Stärke Fraktion gebundenen markierten Phosphatreste können dabei z.B. durch Bestimmung der Menge der in der P-Stärke Fraktion vorliegenden Radioaktivität (z.B. mittels Szintillationszähler) nachgewiesen werden. Mögliche Methoden zum Nachweis eines Proteins, welches P-Stärke als Substrat für eine Phosphorylierungsreaktion benötigt, ist weiter unten

10 unter Allgemeine Methoden, Punkt 11 und in Beispiel 6 beschrieben.

Die Aktivität eines R1 Proteins kann z.B. nachgewiesen werden wie in der Literatur beschrieben (Mikkelsen et al., 2003, Biochemical Journal Intermediate Publication. Published on October 2003 as manuscript BJ20030999; Ritte et al., 2002, PNAS 99,

15 7166-7171).

Welche Positionen der Kohlestoffatome (C-2, C-3 oder C-6) der Glucosemonomere in P-Stärke von einem OK1 Protein bevorzugt phosphoryliert werden, kann z.B. durch Analyse der durch ein Protein phosphorylierten P-Stärken wie bei Ritte et al.

20 (2002, PNAS 99, 7166-7171) beschrieben, ermittelt werden. Hierzu wird durch ein Protein phosphorylierte P-Stärke unter Verwendung von Säure hydrolysiert und anschließend mittels Anionenaustausch-Chromatographie analysiert.

Bevorzugt wird die von einem OK1 Protein phosphorylierte P-Stärke mittels NMR analysiert, um festzustellen, welche Positionen der Kohlestoffatome (C-2, C-3 oder

25 C-6) der Glucosemonomere in der P-Stärke phosphoryliert werden. Eine besonders bevorzugte Methode zur Identifizierung der C-Atom-Positionen eines Glucosemoleküls einer Stärke, welche durch eine von einem OK1 Protein katalysierte Reaktion phosphoryliert werden, ist weiter unten unter Allgemeine Methoden, Punkt 13 beschrieben.

30

Welche Positionen der Kohlestoffatome (C-2, C-3 oder C-6) der Glucosemonomere in Stärke von einem R1 Protein bevorzugt phosphoryliert werden, kann z.B. durch

Analyse der durch ein R1 Protein phosphorylierten Stärken wie bei Ritte et al. (2002, PNAS 99, 7166-7171) beschrieben, ermittelt werden. Hierzu wird durch ein Protein phosphorylierte Stärke unter Verwendung von Säure hydrolysiert und anschließend mittels Anionenaustausch-Chromatographie analysiert.

5

Bevorzugt wird die von einem OK1 Protein phosphorylierte P-Stärke oder die von einem R1 Protein phosphorylierte Stärke mittels NMR analysiert, um festzustellen, welche Positionen der Kohlestoffatome (C-2, C-3 oder C-6) der Glucosemonomere in der P-Stärke bzw. der Stärke phosphoryliert werden. Eine besonders bevorzugte
10 Methode zur Identifizierung der C-Atom-Positionen eines Glucosemoleküls einer Stärke, welche durch eine von einem OK1 Protein oder R1 Protein katalysierte Reaktion phosphoryliert werden, ist weiter unten unter Allgemeine Methoden, Punkt 13 beschrieben.

15 Ein phosphoryliertes Protein, welches als Zwischenprodukt bei der durch ein OK1 Protein vermittelten Phosphorylierung von P-Stärke entsteht, kann wie z.B. bei Ritte et al. (2002, PNAS 99, 7166-7171) oder Mikkelsen et al. (2003, Biochemical Journal Intermediate Publication. Published on October 2003 as manuscript BJ20030999) für ein R1 Protein beschrieben, nachgewiesen werden

20

Zum Nachweis des Vorliegens eines autophosphorylierten Zwischenproduktes wird ein OK1 Protein zunächst in Abwesenheit von Stärke mit markiertem ATP, bevorzugt mit spezifisch in beta-Phosphat-Position markiertem ATP, besonders bevorzugt mit spezifisch mit ^{33}P in beta-Phosphat-Position markiertem ATP inkubiert. Parallel dazu
25 wird ein Reaktionsansatz 2, der jedoch an Stelle von markiertem ATP entsprechende Mengen nicht-markiertes ATP enthält, unter ansonsten gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wird nicht markiertes ATP dem Reaktionsgemisch 1 im Überschuß und eine Mischung aus nicht-markiertem ATP und markiertem ATP (gleiche Menge von markiertem ATP wie zuvor in Reaktionsgemisch 1 eingesetzt
30 und gleiche Menge an nicht-markiertem ATP wie dem Reaktionsgemisch 1 im Überschuß zugesetzt) dem Reaktionsgemisch 2 hinzu gegeben und weiter inkubiert, bevor zu einem Teil A des Reaktionsgemisches 1 (Teil 1A) bzw. zu einem Teil A des

Reaktionsgemisches 2 (Teil 2A) P-Stärke hinzu gegeben werden. Die Reaktion im verbleibenden Teil 1B und Teil 2B des Reaktionsgemisches wird durch Denaturieren des Proteins gestoppt. Das Stoppen des Teils B der Reaktionsgemische kann durch dem Fachmann bekannte Methoden, welche zur Denaturierung von Proteinen führen, bevorzugt durch Zugabe von Natriumlaurylsulfat (SDS) erfolgen. Teil 1A und Teil 2A der Reaktionsgemische werden für mindestens weitere 10 Minuten inkubiert, bevor auch diese Reaktionen gestoppt werden. Die in Teil A bzw. Teil B der jeweiligen Reaktionsgemische vorliegende Stärke wird vom jeweiligen Rest der Reaktionsgemische abgetrennt. Findet die Abtrennung der jeweiligen Stärke z.B. durch Zentrifugation statt, so befindet sich die Stärke des jeweiligen Teils A bzw. jeweiligen Teils B der Reaktionsgemische nach erfolgter Zentrifugation im sedimentierten Pellet und die sich in den jeweiligen Reaktionsgemischen befindlichen Proteine befinden sich im jeweiligen Zentrifugationsüberstand. Der Überstand des Teils 1A bzw. 2A und des Teils 1B bzw. 2B der Reaktionsgemische kann anschließend z.B. jeweils in einer denaturierenden Acrylamidgelelektrophorese, gefolgt von einer Autoradiographie des erhaltenen Acrylamidgels analysiert werden. Zur Quantifizierung der Menge an radioaktiv markierten Proteinen, die mittels Acrylamidgelelektrophorese aufgetrennt wurden, kann z.B. die dem Fachmann bekannte Methode des so genannten „Phosphoimaging“ verwendet werden. Zeigt die Autoradiographie oder die Analyse mittels „Phosphoimager“ von Proteinen im Zentrifugationsüberstand des Teil B des Reaktionsgemisches 1 ein gegenüber dem Zentrifugationsüberstand des Teil A des Reaktionsgemisches 1 ein signifikant erhöhtes Signal, so zeigt dieses, dass das eine Phosphorylierung von Stärke vermittelnde Protein als autophosphoryliertes Zwischenprodukt auftritt. Die Teile A und B des Reaktionsgemisches 2 dienen als Kontrolle und sollten daher im Zentrifugationsüberstand kein signifikant erhöhtes Signal in der Autoradiographie oder in der Analyse mittels „Phosphoimager“ aufweisen.

Zusätzlich kann die im jeweiligen sedimentierten Pellet verbliebene Stärke des jeweiligen Teils A der Reaktionsgemische 1 und 2, gegebenenfalls nach anschließendem Waschen der jeweiligen Stärken, auf das Vorliegen von Stärkephosphat, welches eine dem eingesetzten markierten ATP entsprechende Markierung aufweist, hin untersucht werden. Enthalten die Stärken des Teils A des

Reaktionsgemisches 1 markierte Phosphatrete und zeigt, die Autoradiographie des Zentrifugationsüberstandes des Teil B des Reaktionsgemisches 1 ein gegenüber dem Zentrifugationsüberstand des Teil A des Reaktionsgemisches 1 ein signifikant erhöhtes Signal in der Autoradiographie, so zeigt dieses, dass das eine
5 Phosphorylierung von Stärke vermittelnde Protein als autophosphoryliertes Zwischenprodukt vorliegt. Die Teile A und B des Reaktionsgemisches 2 dienen als Kontrolle und sollten daher im sedimentierten Pellet, enthaltend alpha-1,4-Glucose, kein signifikant erhöhtes Signal für mit ^{33}P markierte alpha-1,4-Glucose aufweisen. Möglichkeiten zum Nachweis eines phosphorylierten OK1 Protein
10 Zwischenproduktes sind weiter unten unter Allgemeine Methoden Punkt 12 und in Beispiel 7 beschrieben.

Dass ein OK1 Protein eine erhöhte Bindungsaktivität zu einer P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweist, kann durch Inkubation des OK1 Proteins
15 mit P-Stärke und nicht-phosphorylierter-Stärke in jeweils getrennten Ansätzen erfolgen.

Zur Inkubation von OK1 Proteinen mit nicht-phosphorylierter-Stärke sind grundsätzlich alle nicht-phosphorylierten-Stärken geeignet. Bevorzugt wird eine nicht-phosphorylierte pflanzliche Stärke, besonders bevorzugt Weizenstärke und
20 insbesondere bevorzugt granuläre Blattstärke einer *Arabidopsis thaliana* Mutante *sex1-3* verwendet.

Methoden z.B. zur Isolierung von Stärke aus Pflanzen sind dem Fachmann bekannt. Alle dem Fachmann bekannten Methoden sind grundsätzlich geeignet, um nicht-phosphorylierte-Stärke aus entsprechenden Pflanzenspezies zu isolieren. Bevorzugt
25 wird die weiter unten (siehe Allgemeine Methoden Punkt 2) beschriebene Methode zur Isolierung von nicht-phosphorylierter-Stärke verwendet.

Zur Inkubation von OK1 Proteinen mit P-Stärke sind grundsätzlich alle Stärken geeignet, die Stärkephosphat enthalten. Auch chemisch phosphorylierte Stärken
30 können hierbei verwendet werden. Vorzugsweise werden zur Inkubation mit OK1 Proteinen P-Stärken eingesetzt, besonders bevorzugt eine nachträglich enzymatisch phosphorylierte pflanzliche Stärke, insbesondere bevorzugt eine nachträglich

enzymatisch phosphorylierte pflanzliche granuläre Stärke, die aus einer *sex-1* Mutante von *Arabidopsis thaliana* isoliert wurde.

- Zum Nachweis einer erhöhten Bindungsaktivität von OK1 Proteinen zu P-Stärke im
- 5 Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke werden OK1 Proteine in voneinander getrennten Ansätzen mit P-Stärke (Ansatz A) und mit nicht-phosphorylierter-Stärke (Ansatz (B)) inkubiert. Nach erfolgter Inkubation werden die nicht an die betreffenden Stärken der Ansätze A und B gebundenen Proteine von den Stärken und den an sie gebundenen Proteinen abgetrennt. Die Bindung zwischen den Proteinen und der P-
- 10 Stärke im Ansatz A und die Bindung zwischen den Proteinen und nicht-phosphorylierter-Stärke im Ansatz B wird anschließend aufgehoben, d.h. die betreffenden Proteine werden in Lösung gebracht. Die in Lösung gebrachten Proteine des Ansatzes A und des Ansatzes B können dann von den betreffenden Stärken, die in den entsprechenden Ansätzen vorliegen, abgetrennt werden.
- 15 Daraufhin kann eine Auftrennung der isolierten P-Stärke-bindenden-Proteine des Ansatzes A bzw. der isolierten nicht-phosphorylierte-Stärke-bindenden-Proteine des Ansatzes B, mit Hilfe von dem Fachmann bekannten Methoden, wie z.B. Gelfiltration, chromatographische Verfahren, Elektrophorese, SDS-Acrylamidgelelektrophorese etc. erfolgen. Durch Vergleich der Mengen aufgetrennter Proteine des Ansatzes A
- 20 mit den Mengen korrespondierender aufgetrennter Proteine des Ansatzes B, kann ermittelt werden, ob ein Protein eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierten-Stärke aufweisen. Methoden, mit welchen eine bevorzugte Bindung von Proteinen an P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke nachgewiesen werden kann, sind weiter unten in Beispiel 8
- 25 beschrieben.

Die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz codiert ein OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* und die unter SEQ ID NO 4 dargestellte Aminosäuresequenz codiert ein OK 1 Protein aus *Oryza sativa*.

30

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weisen Aminosäuresequenzen codierend ein OK1 Proteine eine Identität mit der in SEQ ID

NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Sequenz eine Identität von mindestens 60%, insbesondere von mindestens 70%, bevorzugt von mindestens 80% und besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von mindestens 95% auf.

5

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weist das OK1 Protein eine Phosphohistidindomäne auf. Aminosäuresequenzen, codierend OK1 Proteine, enthalten eine Phosphohistidindomäne, die zu der unter SEQ ID NO 5 dargestellten Aminosäuresequenz der Phosphohistidindomäne des OK1 Proteins aus *Arabidopsis*
10 *thaliana* eine Identität von mindestens 60%, insbesondere von mindestens 70%, bevorzugt von mindestens 80% und besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von mindestens 95% aufweist.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft eine
15 erfindungsgemäße genetisch modifizierte Pflanzenzelle oder eine erfindungsgemäße genetisch modifizierte Pflanze, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom der Pflanze besteht.

In diesem Zusammenhang bedeutet der Begriff „genetische Modifikation“ das
20 Einführen von homologen und/oder heterologen fremden Nucleinsäuremolekülen in das Genom einer Pflanzenzelle oder in das Genom einer Pflanze, wobei besagtes Einführen dieser Moleküle zur Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins und zur Erhöhung der Aktivität eines R1 Proteins führt.

Durch Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls sind die erfindungsgemäßen
25 Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen in ihrer genetischen Information verändert. Das Vorhandensein oder die Expression eines fremden Nucleinsäuremoleküls führt zu einer phänotypischen Veränderung. „Phänotypische“ Veränderung bedeutet dabei vorzugsweise eine messbare Veränderung einer oder mehrerer Funktionen der Zellen. Beispielsweise zeigen die genetisch modifizierten
30 erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die genetisch modifizierten erfindungsgemäßen Pflanzen aufgrund des Vorhandenseins oder bei Expression

eingeführter Nucleinsäuremoleküle eine Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins und eine Erhöhung der Aktivität eines R1 Proteins.

Unter dem Begriff "fremdes Nukleinsäuremolekül" versteht man im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein solches Molekül, das entweder natürlicherweise in
5 entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen nicht vorkommt, oder das in der konkreten räumlichen Anordnung nicht natürlicherweise in Wildtyp-Pflanzenzellen vorkommt oder das an einem Ort im Genom der Wildtyp-Pflanzenzelle lokalisiert ist, an dem es natürlicherweise nicht vorkommt. Bevorzugt ist das fremde Nukleinsäuremolekül ein
10 rekombinantes Molekül, das aus verschiedenen Elementen besteht, deren Kombination oder spezifische räumliche Anordnung natürlicherweise in pflanzlichen Zellen nicht auftritt.

Prinzipiell kann ein fremdes Nucleinsäuremolekül jedes beliebige Nucleinsäuremolekül sein, das in der Pflanzenzelle oder Pflanze eine Erhöhung der
15 Aktivität eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins bewirkt.

Unter dem Begriff „Genom“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung die Gesamtheit des in einer pflanzlichen Zelle vorliegenden Erbmaterials verstanden werden. Dem Fachmann ist bekannt, dass neben dem Zellkern auch andere
20 Kompartimente (z.B. Plastiden, Mitochondrien) Erbmaterial enthalten.

In einer weiteren Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein fremdes Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein codiert, bevorzugt ein OK1 Protein
25 aus *Arabidopsis thaliana* oder ein OK1 Protein aus *Oryza sativa*.

In einer weiteren Ausführungsform codiert das fremde Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein mit der in SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz.
30

In einer weiteren Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein

fremdes Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein codiert, bevorzugt ein R1 Protein aus Kartoffel oder ein OK1 Protein aus *Oryza sativa*.

5 In einer weiteren Ausführungsform codiert das fremde Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein aus Kartoffel mit der in GenBank Acc.: Y09533 (22-JUL-2003 Rel. 76, Last updated, Version 2) angegebenen Aminosäuresequenz. Die Nucleinsäuremoleküle und Aminosäuresequenzen codierend ein R1 Protein aus Kartoffel (GenBank Acc.: Y09533) ist durch Nennung der Referenzen ausdrücklich in die Beschreibung der vorliegenden Anmeldung aufgenommen.

10

In einer weiteren Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Pflanzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen dadurch gekennzeichnet, dass ein erstes fremdes Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein codiert und ein zweites fremdes Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein codiert.

15

Bei den zur genetischen Modifikation in die Pflanzelle oder Pflanze eingebrachten fremden Nucleinsäuremolekülen kann es sich um ein einzelnes Nucleinsäuremolekül oder um mehrere Nucleinsäuremoleküle handeln. Es kann sich daher sowohl um Nucleinsäuremoleküle handeln, die OK 1 Proteine codierende Nucleinsäuresequenzen und R1 Proteine codierende Nucleinsäuresequenzen enthalten, als auch um Nucleinsäuremoleküle bei denen die OK 1 Proteine codierenden Nucleinsäuresequenzen und die R1 Proteine codierenden Nucleinsäuresequenzen auf verschiedenen Nucleinsäuremolekülen vorliegen. Die ein OK1 Protein codierenden Nucleinsäuresequenzen und die ein R1 Protein codierenden Nucleinsäuresequenzen können beispielsweise in einem Vektor, Plasmid oder linearen Nucleinsäuremolekül gleichzeitig enthalten sein, oder aber Bestandteile von zwei jeweils voneinander getrennten Vektoren, Plasmiden oder linearen Nucleinsäuremolekülen sein.

25 Liegen die ein OK1 Protein codierenden Nucleinsäuresequenzen und die ein R1 Protein codierenden Nucleinsäuresequenzen in zwei voneinander getrennten Nucleinsäuremolekülen vor, so können sie entweder zeitgleich („Cotransformation“) oder auch nacheinander, d.h. zeitlich aufeinander folgend („Supertransformation“) in

- das Genom der Pflanzenzelle oder Pflanze eingeführt werden. Die voneinander getrennten Nukleinsäuremoleküle können auch in verschiedene individuelle Pflanzenzellen oder Pflanzen einer Spezies eingeführt werden. Es können dadurch Pflanzenzellen oder Pflanzen erzeugt werden, bei welchen die Aktivität von entweder
- 5 mindestens einem OK1 Protein oder aber mindestens einem R1 Protein erhöht ist. Solche Pflanzen können dann durch anschließendes Kreuzen der Pflanzen, bei welchen die Aktivität eines OK1 Proteins erhöht ist, mit solchen, bei welchen die Aktivität eines R1 Proteins erhöht ist, hergestellt werden.
- 10 Weiterhin können zur Einführung eines fremden Nukleinsäuremoleküls anstelle einer Wildtyp-Pflanzenzelle bzw. Wildtyp-Pflanze, eine Mutantenzelle bzw. eine Mutante, die sich dadurch auszeichnet, dass sie bereits eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins oder eine erhöhte Aktivität eines R1 Proteins aufweist, verwendet werden. Bei den Mutanten kann es sich sowohl um spontan (natürlich) auftretende Mutanten,
- 15 als auch um solche handeln, die durch den gezielten Einsatz von Mutagenen (wie z.B. chemische Agentien, ionisierende Strahlung) oder gentechnischen Verfahren (z.B. T-DNA-activation-tagging, Transposon-activation tagging, *in situ* activation, *in vivo*- Mutagenese) erzeugt wurden.
- Erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen können daher
- 20 auch durch Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls, welches zur Erhöhung der Aktivität eines R1 Proteins führt, in eine Mutantenzelle oder eine Mutante, die bereits eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins aufweist, hergestellt werden. Erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen können auch durch Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls, welches zur Erhöhung der
- 25 Aktivität eines OK1 Proteins führt, in eine Mutantenzelle oder eine Mutante, die bereits eine erhöhte Aktivität eines R1 Proteins aufweist, hergestellt werden.
- Erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen können auch erzeugt werden, indem eine Mutante, bei welcher die Aktivität eines OK1 Proteins erhöht ist, mit einer Pflanze, die aufgrund der Einführung eines fremden
- 30 Nucleinsäuremoleküls eine erhöhte Aktivität eines R1 Proteins aufweist, kreuzt. Ebenso ist es möglich, erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen zu erzeugen, indem man eine Mutante, bei welcher die Aktivität eines R1

Proteins erhöht ist, mit einer Pflanze, die aufgrund der Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins aufweist, kreuzt.

- Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle steht eine Vielzahl von
- 5 Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung der DNA mittels des biolistischen Ansatzes sowie weitere Möglichkeiten.
- 10 Die Verwendung der Agrobakterien-vermittelten Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120516; Hoekema, IN: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V. Alblaserdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant Sci. 4, 1-46 und bei An et al. EMBO J. 4, (1985), 277-287 beschrieben worden. Für die Transformation von Kartoffel, siehe z.B. Rocha-
- 15 Sosa et al., EMBO J. 8, (1989), 29-33).

- Auch die Transformation monokotyler Pflanzen mittels auf *Agrobacterium* Transformation basierender Vektoren wurde beschrieben (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22, (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6, (1994) 271-282; Deng et al, Science
- 20 in China 33, (1990), 28-34; Wilmink et al., Plant Cell Reports 11, (1992), 76-80; May et al., Bio/Technology 13, (1995), 486-492; Conner und Domisse, Int. J. Plant Sci. 153 (1992), 550-555; Ritchie et al, Transgenic Res. 2, (1993), 252-265). Alternatives System zur Transformation von monokotylen Pflanzen ist die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes (Wan und Lemaux, Plant Physiol. 104, (1994), 37-48;
- 25 Vasil et al., Bio/Technology 11 (1993), 1553-1558; Ritala et al., Plant Mol. Biol. 24, (1994), 317-325; Spencer et al., Theor. Appl. Genet. 79, (1990), 625-631), die Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Einbringung von DNA mittels Glasfasern. Insbesondere die Transformation von Mais wird in der Literatur mehrfach beschrieben (vgl. z. B. WO95/06128,
- 30 EP0513849, EP0465875, EP0292435; Fromm et al., Biotechnology 8, (1990), 833-844; Gordon-Kamm et al., Plant Cell 2, (1990), 603-618; Koziel et al., Biotechnology 11 (1993), 194-200; Moroc et al., Theor. Appl. Genet. 80, (1990), 721-726).

Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten wurde bereits beschrieben, z.B. für Gerste (Wan und Lemaux, s.o.; Ritala et al., s.o.; Krens et al., Nature 296, (1982), 72-74) und für Weizen (Nehra et al., Plant J. 5, (1994), 285-297; Becker et al., 1994, Plant Journal 5, 299-307). Alle vorstehenden Methoden sind im

5 Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet.

Pflanzenzellen und Pflanzen, die durch Einführung eines OK1 Proteins und/oder eines R1 Proteins genetisch modifiziert sind, lassen sich von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen unter anderem dadurch unterscheiden, dass sie ein fremdes

10 Nucleinsäuremolekül enthalten, das natürlicherweise in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht vorkommt oder dadurch, dass ein solches Molekül an einem Ort im Genom der erfindungsgemäßen Pflanzenzelle oder im Genom der erfindungsgemäßen Pflanze integriert vorliegt, an dem es bei Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht vorkommt, d.h. in einer anderen genomischen

15 Umgebung. Ferner lassen sich derartige erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen dadurch unterscheiden, dass sie mindestens eine Kopie des fremden Nucleinsäuremoleküls stabil integriert in ihr Genom enthalten, gegebenenfalls zusätzlich zu natürlicherweise in den Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen

20 vorkommenden Kopien eines solchen Moleküls. Handelt es sich bei dem (den) in die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen eingeführten fremden Nucleinsäuremolekül(en) um zusätzliche Kopien zu bereits natürlicherweise in den Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen vorkommenden Molekülen, so lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen

25 Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen insbesondere dadurch unterscheiden, dass diese zusätzliche(n) Kopie(n) an Orten im Genom lokalisiert ist (sind), an denen sie bei Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht vorkommt (vorkommen). Dies lässt sich beispielsweise mit Hilfe einer Southern Blot-Analyse nachprüfen.

30 Weiterhin lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen vorzugsweise durch mindestens eines der folgenden Merkmale unterscheiden: Ist ein

eingeführtes fremde Nucleinsäuremolekül heterolog in Bezug auf die Pflanzenzelle oder Pflanze, so weisen die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen Transkripte der eingeführten Nucleinsäuremoleküle auf. Diese lassen sich z. B. durch Northern-Blot-Analyse oder durch RT-PCR
5 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) nachweisen. Erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, die ein Antisense- und/oder ein RNAi-Transkript exprimieren, können z.B. mit Hilfe von spezifischen Nucleinsäure-Sonden, die komplementär zur der für das Protein codierenden (natürlich in der Pflanzenzelle vorkommenden) RNA sind, nachgewiesen werden. Vorzugsweise
10 enthalten die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen ein Protein, das durch ein eingeführtes Nucleinsäuremolekül codiert wird. Dies kann z. B. durch immunologische Methoden, insbesondere durch eine Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden.

Ist ein eingeführtes fremde Nucleinsäuremolekül homolog in Bezug auf die
15 Pflanzenzelle oder Pflanze, können die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen beispielsweise aufgrund der zusätzlichen Expression der eingeführten fremden Nucleinsäuremoleküle unterschieden werden. Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen enthalten vorzugsweise
20 Transkripte der fremden Nucleinsäuremoleküle. Dies kann z. B. durch Northern-Blot-Analyse oder mit Hilfe der so genannten quantitativen PCR nachgewiesen werden.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und bei den erfindungsgemäßen Pflanzen um transgene
25 Pflanzenzellen bzw. transgene Pflanzen.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, wobei das fremde Nucleinsäuremolekül codierend ein OK1 Protein ausgewählt ist, aus der
30 Gruppe bestehend aus

- a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein mit der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz codieren;

- b) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die Aminosäuresequenz umfasst, die von der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird;
- c) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Sequenz eine
5 Identität von mindestens 60% zu der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz aufweisen;
- d) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Sequenz eine Identität von mindestens 60% zu der Aminosäuresequenz aufweist; die von der codierenden Region der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder von der
10 codierenden Region der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird;
- e) Nucleinsäuremolekülen, die die unter SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleotidsequenz oder eine komplementäre Sequenz umfassen;
- f) Nucleinsäuremolekülen, die die Nucleotidsequenz der im Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder Plasmid pMI50 enthaltenen Insertion umfassen;
- 15 g) Nucleinsäuremolekülen, welche zu den unter a), b), e) oder f) beschriebenen Nucleinsäuresequenzen eine Identität von mindestens 70% aufweisen;
- h) Nucleinsäuremolekülen, welche mit mindestens einem Strang der unter a), b), ,e) oder f) beschriebenen Nucleinsäuremolekülen unter stringenten Bedingungen hybridisieren;
- 20 i) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter a), b), e) oder f) genannten Nucleinsäuremoleküle abweicht; und
- j) Nucleinsäuremolekülen, die Fragmente, allelische Varianten und/oder Derivate der unter a), b), c), d), e), f), g), h) oder i) genannten Nucleinsäuremoleküle
25 darstellen.

Die in SEQ ID NO 1 dargestellte Nucleinsäuresequenz ist eine cDNA Sequenz, die die codierende Region für ein OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* und die in SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleinsäuresequenz ist eine cDNA Sequenz, die die
30 codierende Region für ein OK1 Protein aus *Oryza sativa* umfasst.

Das Plasmid A.t.-OK1-pGEM, enthaltend eine cDNA, die ein OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* codiert und das Plasmid pMI50, enthaltend eine cDNA, die ein

OK1 Protein aus *Oryza sativa* codiert, wurden nach dem Budapester Vertrag hinterlegt bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Deutschland. Die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz kann von der codierenden Region der in Plasmid A.t.-OK1-pGEM integrierten cDNA Sequenz abgeleitet werden und codiert für ein OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana*. Die in SEQ ID NO 4 dargestellte Aminosäuresequenz kann von der codierenden Region der in Plasmid pMI50 integrierten cDNA Sequenz abgeleitet werden und codiert für ein OK1 Protein aus *Oryza sativa*. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch Nucleinsäuremoleküle, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines OK1 Proteins codieren, das die Aminosäuresequenz umfasst, die von der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder die von der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird, wobei das codierte Protein eine Identität von mindestens 70% bevorzugt von mindestens 80%, besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von 95% zu der Aminosäuresequenz, die von der Insertion in A.t.-OK1-pGEM oder pMI50 abgeleitet werden kann, aufweist.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Nucleinsäuremoleküle, die ein OK1 Protein codieren und die codierende Region der unter SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 dargestellten Nucleotidsequenzen oder zu diesen komplementäre Sequenzen umfassen, Nucleinsäuremoleküle, die die codierende Region der Nucleotidsequenz der im Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder Plasmid pMI50 enthaltenen Insertion umfassen und Nucleinsäuremoleküle, die zu den genannten Nucleinsäuremolekülen eine Identität von mindestens 70%, bevorzugt von mindestens 80%, besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von mindestens 95% aufweisen.

Mit Hilfe der Sequenzinformation erfindungsgemäßer Nucleinsäuremoleküle bzw. mit Hilfe eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls ist es dem Fachmann nun möglich, homologe Sequenzen aus anderen Pflanzenspezies, vorzugsweise aus Stärke speichernden Pflanzen, bevorzugt aus Pflanzenspezies der Gattung *Oryza*, insbesondere *Oryza sativa* oder aus *Arabidopsis thaliana* zu isolieren. Dies kann beispielsweise mit Hilfe konventioneller Methoden, wie dem Durchmustern von cDNA oder genomischen Banken mit geeigneten Hybridisierungsproben erfolgen. Dem Fachmann ist bekannt, dass die Isolierung homologer Sequenzen auch mit Hilfe von

(degenerierten) Oligonucleotiden und der Verwendung von PCR basierten Methoden erfolgen kann.

Auch die Durchmusterung von Datenbanken wie sie z.B. von EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/index.htm>) oder NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zur Verfügung gestellt werden, kann zur Identifizierung von homologen Sequenzen, die für OK1 Protein codieren, dienen. Hierbei wird eine oder werden mehrere Sequenzen als so genannte Abfrage (= query) vorgegeben. Diese Abfragesequenz wird dann mittels statistischen Computerprogrammen mit Sequenzen, die in den ausgewählten Datenbanken
10 enthalten sind, verglichen. Solche Datenbankabfragen (z.B. blast- oder fasta searches) sind dem Fachmann bekannt und können bei verschiedenen Anbietern durchgeführt werden.

Wird eine solche Datenbankabfrage z.B. beim NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt, so sollen die
15 Standardeinstellungen, die für die jeweilige Vergleichsanfrage vorgegeben sind, benutzt werden. Für Proteinsequenzvergleiche (blastp) sind dieses folgende Einstellungen: Limit entrez = nicht aktiviert; Filter = low complexity aktiviert; Expect value = 10; word size = 3; Matrix = BLOSUM62; Gap costs: Existence = 11, Extension = 1.

20 Für Nucleinsäuresequenzvergleich (blastn) sind folgende Parameter einzustellen: Limit entrez = nicht aktiviert; Filter = low complexity aktiviert; Expect value = 10; word size = 11.

Bei einer solchen Datenbankrecherche können z.B. die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Sequenzen als Abfragesequenz (query) verwendet werden, um
25 weitere Nucleinsäuremoleküle und/oder Proteine zu identifizieren, die ein OK1 Protein codieren.

Mit Hilfe der beschriebenen Methoden ist es auch möglich, erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle zu identifizieren und/oder zu isolieren, die mit der unter SEQ ID NO 1 oder unter SEQ ID NO 3 angegebenen Sequenz hybridisieren und die ein
30 OK1 Protein codieren.

Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise

unter stringenten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrock et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) beschrieben sind. Besonders bevorzugt bedeutet "Hybridisierung" eine Hybridisierung unter den folgenden Bedingungen:

5 Hybridisierungspuffer:

2xSSC; 10xDenhardt-Lösung (Fikoll 400+PEG+BSA; Verhältnis 1:1:1); 0,1% SDS; 5 mM EDTA; 50 mM Na₂HPO₄; 250 µg/ml Heringssperma DNA; 50 µg/ml tRNA; oder 25 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2; 1 mM EDTA; 7% SDS

Hybridisierungstemperatur:

10 T=65 bis 68°C

Waschpuffer: 0,1xSSC; 0,1% SDS

Waschtemperatur: T=65 bis 68°C.

- Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen
- 15 hybridisieren, können prinzipiell aus jeder beliebigen Pflanzenspezies stammen, die ein entsprechendes Protein codiert, vorzugsweise stammen sie aus Stärke speichernden Pflanzen, bevorzugt aus Spezies der (systematischen) Familie Poacea, insbesondere bevorzugt aus Spezies der Gattung *Oryza*.
- Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Molekülen hybridisieren,
- 20 können z.B. aus genomischen oder aus cDNA-Bibliotheken isoliert werden. Die Identifizierung und Isolierung derartiger Nucleinsäuremoleküle kann dabei unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Teile dieser Moleküle bzw. der reversen Komplemente dieser Moleküle erfolgen, z.B. mittels Hybridisierung nach Standardverfahren (siehe z.B. Sambrock et al., 1989, Molecular
- 25 Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) oder durch Amplifikation mittels PCR.

- Als Hybridisierungsprobe können z.B. Nucleinsäuremoleküle verwendet werden, die exakt die oder im Wesentlichen die unter SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 angegebene Nucleotidsequenz oder Teile dieser Sequenzen aufweisen. Bei den als
- 30 Hybridisierungsprobe verwendeten Fragmenten kann es sich auch um synthetische Fragmente oder Oligonucleotide handeln, die mit Hilfe der gängigen Synthesetechniken hergestellt wurden und deren Sequenz im wesentlichen mit der

eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls übereinstimmt. Hat man Gene identifiziert und isoliert, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuresequenzen hybridisieren, sollte eine Bestimmung der Sequenz und eine Analyse der Eigenschaften der von dieser Sequenz codierten Proteine erfolgen, um festzustellen, ob es sich um ein OK1 Protein handelt. Hierzu eignen sich insbesondere Homologievergleiche auf der Ebene der Nucleinsäure- oder Aminosäuresequenz sowie die Bestimmung der enzymatischen Aktivität. Die Aktivität eines OK1 Proteins kann z.B. wie oben oder unter Allgemeinen Methoden Punkt 11 beschrieben, erfolgen. Eine bevorzugte Bindungsaffinität zu P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke, und Autophosphorylierung eines OK1 Proteins können nach den oben bereits und unter Allgemeine Methoden Punkte 8 und 12 beschriebenen Methoden nachgewiesen werden.

Die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisierenden Moleküle umfassen insbesondere Fragmente, Derivate und allelische Varianten der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle, die ein OK1 Protein aus Pflanzen, vorzugsweise aus Stärke speichernden Pflanzen, bevorzugt aus Spezies der (systematischen) Familie *Poacea*, insbesondere bevorzugt aus Spezies der Gattung *Oryza* codieren. Der Begriff „Derivat“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass die Sequenzen dieser Moleküle sich von den Sequenzen der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle an einer oder mehreren Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Identität zu diesen Sequenzen aufweisen. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen Nucleinsäuremolekülen können dabei z.B. durch Deletion, Addition, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.

25

Der Begriff „Identität“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Sequenzidentität über die gesamte Länge der codierenden Region von mindestens 60%, insbesondere eine Identität von mindestens 80%, vorzugsweise über 80%, besonders bevorzugt über 90% und insbesondere von mindestens 95%.

30 Unter dem Begriff „Identität“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung die Anzahl der übereinstimmenden Aminosäuren/Nucleotide (Identität) mit anderen Proteinen/Nucleinsäuren, ausgedrückt in Prozent verstanden werden. Bevorzugt wird

die Identität durch Vergleiche der SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 für Aminosäuren oder SEQ. ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 für Nucleinsäuren zu anderen Proteinen/Nucleinsäuren mit Hilfe von Computerprogrammen ermittelt. Weisen Sequenzen, die miteinander verglichen werden, unterschiedliche Längen auf, ist die

5 Identität so zu ermitteln, dass die Anzahl an Aminosäuren, welche die kürzere Sequenz mit der längeren Sequenz gemeinsam hat, den prozentualen Anteil der Identität bestimmt. Vorzugsweise wird die Identität mittels des bekannten und der Öffentlichkeit zur Verfügung stehenden Computerprogramms ClustalW (Thompson et al., Nucleic Acids Research 22 (1994), 4673-4680) ermittelt. ClustalW wird öffentlich

10 zur Verfügung gestellt von Julie Thompson (Thompson@EMBL-Heidelberg.DE) und Toby Gibson (Gibson@EMBL-Heidelberg.DE), European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D 69117 Heidelberg, Germany. ClustalW kann ebenfalls von verschiedenen Internetseiten, u.a. beim IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, B.P.163, 67404 Illkirch Cedex, France;

15 ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/) und beim EBI (ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/) sowie bei allen gespiegelten Internetseiten des EBI (European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK), heruntergeladen werden.

Vorzugsweise wird das ClustalW Computerprogramm der Version 1.8 benutzt, um

20 die Identität zwischen erfindungsgemäßen Proteinen und anderen Proteinen zu bestimmen. Dabei sind folgende Parameter einzustellen: KTUPLE=1, TOPDIAG=5, WINDOW=5, PAIRGAP=3, GAOPEN=10, GAPEXTEND=0.05, GAPDIST=8, MAXDIV=40, MATRIX=GONNET, ENDGAPS(OFF), NOPGAP, NOHGAP.

Vorzugsweise wird das ClustalW Computerprogramm der Version 1.8 benutzt, um

25 die Identität zwischen z.B. der Nucleotidsequenz der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle und der Nucleotidsequenz von anderen Nucleinsäuremolekülen zu bestimmen. Dabei sind folgende Parameter einzustellen: KTUPLE=2, TOPDIAGS=4, PAIRGAP=5, DNAMATRIX:IUB, GAOPEN=10, GAPEXT=5, MAXDIV=40, TRANSITIONS: unweighted.

30

Identität bedeutet ferner, dass funktionelle und/oder strukturelle Äquivalenz zwischen den betreffenden Nucleinsäuremolekülen oder den durch sie codierten Proteinen,

- besteht. Bei den Nucleinsäuremolekülen, die homolog zu den oben beschriebenen Molekülen sind und Derivate dieser Moleküle darstellen, handelt es sich in der Regel um Variationen dieser Moleküle, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen Pflanzenspezies oder um Mutationen, wobei diese Mutationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden. Ferner kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte Sequenzen handeln. Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende Varianten handeln, als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-Techniken erzeugte Varianten. Eine spezielle Form von Derivaten stellen z.B. Nucleinsäuremoleküle dar, die auf Grund der Degeneration des genetischen Codes von erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen abweichen.
- 15 Die von den verschiedenen Derivaten der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierten Proteine weisen bestimmte gemeinsame Charakteristika auf. Dazu können z.B. biologische Aktivität, Substratspezifität, Molekulargewicht, immunologische Reaktivität, Konformation etc. gehören, sowie physikalische Eigenschaften wie z.B. das Laufverhalten in Gelelektrophoresen, chromatographisches Verhalten, Sedimentationskoeffizienten, Löslichkeit, spektroskopische Eigenschaften, Stabilität; pH-Optimum, Temperatur-Optimum etc.. Bevorzugte Eigenschaften eines OK1 Proteins wurden oben bereits im Detail erörtert und sind hier entsprechend anzuwenden.
- 25 Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können beliebige Nucleinsäuremoleküle sein, insbesondere DNA- oder RNA-Moleküle, beispielsweise cDNA, genomische DNA, mRNA etc. Sie können natürlich vorkommende Moleküle sein, oder durch gentechnische oder chemische Syntheseverfahren hergestellte Moleküle. Sie können einzelsträngige Moleküle sein, die entweder den codierenden oder den nicht codierenden Strang enthalten, oder doppelsträngige Moleküle.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, wobei das fremde Nucleinsäuremolekül codierend ein R1 Protein ausgewählt ist, aus der Gruppe bestehend aus

- 5 a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein mit der unter SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 15 oder SEQ ID NO 17 angegebenen Aminosäuresequenz codieren,
 - b) Nucleinsäuremolekülen, die die unter SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 14 oder SEQ ID NO 16 dargestellte
10 Nucleotidsequenz oder eine komplementäre Sequenz umfassen;
 - c) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter a) oder b) genannten Nucleinsäuremoleküle abweicht;
 - d) Nucleinsäuremolekülen, welche zu den unter a) oder b) beschriebenen
15 Nucleinsäuresequenzen eine Identität von mindestens 70% aufweisen und
 - e) Nucleinsäuremolekülen, welche mit mindestens einem Strang der unter a) oder b) beschriebenen Nucleinsäuremolekülen unter stringenten Bedingungen hybridisieren.
- 20 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, wobei das fremde Nucleinsäuremolekül ausgewählt ist, aus der Gruppe bestehend aus
- a) T-DNA Molekülen, die durch Integration in das pflanzliche Genom zu einer Erhöhung der Expression eines OK1 Gens und/oder eines R1 Gens führen (T-DNA activation tagging);
25
 - b) DNA Molekülen, die Transposons enthalten, die durch Integration in das pflanzliche Genom zu einer Erhöhung der Expression eines OK1 Gens und/oder eines R1 Gens führen (Transposon activation tagging);
 - c) DNA Molekülen, die ein OK1 Protein und/oder ein R1 Protein codieren und mit
30 regulatorischen Sequenzen verknüpft sind, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten und zu einer Erhöhung einer OK1 Protein und/oder R1 Protein Aktivität in der Zelle führen,

- d) Mittels *in vivo*-Mutagenese eingeführte Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in mindestens einem endogenen OK1 Protein codierenden Gen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Erhöhung der Expression eines OK1 Protein codierenden Gens bewirkt.
- 5 e) Mittels *in vivo*-Mutagenese eingeführte Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in mindestens einem endogenen R1 Protein codierenden Gen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Erhöhung der Expression eines R1 Protein codierenden Gens bewirkt.
- 10

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung können erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen auch durch die Verwendung der so genannten Insertionsmutagenese (Übersichtsartikel: Thorneycroft et al., 2001, Journal of experimental Botany 52 (361), 1593-1601) hergestellt werden. Unter Insertionsmutagenese ist im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung insbesondere das Inserieren von Transposons oder so genannter Transfer DNA (T-DNA) in ein Gen oder in die Nähe eines Gens, codierend ein OK1 Protein und/oder ein codierend ein R1 Protein zu verstehen, wobei dadurch die Aktivität eines OK1 Proteins und/oder eines R1 Proteins in der betreffenden Zelle erhöht wird.

15

20

Bei den Transposons kann es sich dabei sowohl um solche handeln, die in der Zelle natürlicherweise vorkommen (endogene Transposons), als auch um solche, die natürlicherweise nicht in besagter Zelle vorkommen, sondern mittels gentechnischer Methoden, wie z.B. Transformation der Zelle, in die Zelle eingeführt wurden (heterologe Transposons). Die Veränderung der Expression von Genen mittels Transposons ist dem Fachmann bekannt. Eine Übersicht über die Nutzung von endogenen und heterologen Transposons als Werkzeuge in der Pflanzenbiotechnologie ist in Ramachandran und Sundaresan (2001, Plant Physiology and Biochemistry 39, 234-252) dargestellt.

25

30

Die T-DNA Insertionsmutagenese beruht darauf, dass bestimmte Abschnitte (T-DNA) von Ti-Plasmiden aus *Agrobacterium* in das Genom von pflanzlichen Zellen integrieren können. Der Ort der Integration in das pflanzliche Chromosom ist dabei nicht festgelegt, sondern kann an jeder beliebigen Stelle erfolgen. Integriert die T-DNA in einen Abschnitt oder in die Nähe eines Abschnittes des Chromosoms, der eine Genfunktion darstellt, so kann dieses zur Erhöhung der Genexpression und damit auch zur Änderung der Aktivität eines durch das betreffende Gen codierten Proteins führen.

Die in das Genom inserierten Sequenzen (insbesondere Transposons oder T-DNA) zeichnen sich dabei dadurch aus, dass sie Sequenzen enthalten, die zu einer Aktivierung von regulatorischen Sequenzen eines OK1 Gens führen ("activation tagging").

Erfindungsgemäße Pflanzenzellen und Pflanzen können mit Hilfe der Methode des so genannten "activation taggings" (siehe z. B. Walden et al., *Plant J.* (1991), 281-288; Walden et al., *Plant Mol. Biol.* 26 (1994), 1521-1528) erzeugt werden. Diese Methode beruht auf der Aktivierung endogener Promotoren durch "enhancer"-Sequenzen, wie z.B. dem Enhancer des 35S RNA-Promoters des Blumenkohlmosaikvirus oder dem Octopinsynthese-Enhancers.

Unter dem Begriff „T-DNA activation tagging“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein T-DNA Fragment verstanden werden, das "enhancer"-Sequenzen enthält und durch Integration in das Genom einer Pflanzenzelle zu der Erhöhung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins und/oder mindestens eines R1 Proteins führt.

Unter dem Begriff „Transposon activation tagging“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Transposon verstanden werden, das "enhancer"-Sequenzen enthält und durch Integration in das Genom einer Pflanzenzelle zu der Erhöhung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins und/oder mindestens eines R1 Proteins führt.

In einer weiteren Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen DNA Moleküle, die ein OK1 Protein und/oder ein R1 Protein codieren, mit regulatorischen Sequenzen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen initiieren (Promotoren) und zu einer Erhöhung einer OK1 Protein und/oder R1 Protein Aktivität in der Zelle führen.

- 5 Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle liegen dabei zu den regulatorischen Sequenzen in „sense“-Orientierung vor.

Zur Expression von erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen, die ein OK1 Protein und/oder R1 Protein codieren, werden diese vorzugsweise mit regulatorischen DNA-
10 Sequenzen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten. Hierzu zählen insbesondere Promotoren. Generell kommt für die Expression jeder in pflanzlichen Zellen aktive Promotor in Frage.

Der Promotor kann dabei so gewählt sein, dass die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt der
15 Pflanzenentwicklung oder zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt. Sowohl in Bezug auf die Pflanze als auch in Bezug auf das Nucleinsäuremolekül kann der Promotor homolog oder heterolog sein.

Geeignete Promotoren sind z.B. der Promotor der 35S RNA des Cauliflower Mosaic Virus und der Ubiquitin-Promotor aus Mais für eine konstitutive Expression, der
20 Patatingen-Promotor B33 (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) für eine knollenspezifische Expression in Kartoffeln oder ein Promotor, der eine Expression lediglich in photosynthetisch aktiven Geweben sicherstellt, z.B. der ST-LS1-Promotor (Stockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445-2451) oder für eine endosperm-spezifische Expression der
25 HMG-Promotor aus Weizen, der USP-Promotor, der Phaseolinpromotor, Promotoren von Zein-Genen aus Mais (Pedersen et al., Cell 29 (1982), 1015-1026; Quatroccio et al., Plant Mol. Biol. 15 (1990), 81-93), Glutelin-Promotor (Leisy et al., Plant Mol. Biol. 14 (1990), 41-50; Zheng et al., Plant J. 4 (1993), 357-366; Yoshihara et al., FEBS Lett. 383 (1996), 213-218) oder Shrunken-1 Promotor (Werr et al., EMBO J. 4 (1985),
30 1373-1380). Es können jedoch auch Promotoren verwendet werden, die nur zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt aktiviert werden (siehe beispielsweise WO 9307279). Von besonderem Interesse können hierbei

Promotoren von heat-shock Proteinen sein, die eine einfache Induktion erlauben. Ferner können samenspezifische Promotoren verwendet werden, wie z.B. der USP-Promoter aus *Vicia faba*, der eine samenspezifische Expression in *Vicia faba* und anderen Pflanzen gewährleistet (Fiedler et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 669-679; 5 Bäumlein et al., Mol. Gen. Genet. 225 (1991), 459-467).

Ferner kann eine Terminationssequenz (Polyadenylierungssignal) vorhanden sein, die der Addition eines Poly-A-Schwanzes an das Transkript dient. Dem Poly-A-Schwanz wird eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte beigemessen. 10 Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben (vgl. Gielen et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) und sind beliebig austauschbar.

Es können auch Intronsequenzen zwischen dem Promotor und der codierenden Region vorhanden sein. Solche Intronsequenzen können zur Stabilität der 15 Expression und zu einer erhöhten Expression in Pflanzen führen (Callis et al., 1987, Genes Devel. 1, 1183-1200; Luehrsen, and Walbot, 1991, Mol. Gen. Genet. 225, 81-93; Rethmeier, et al., 1997; Plant Journal. 12(4):895-899; Rose and Beliakoff, 2000, Plant Physiol. 122 (2), 535-542; Vasil et al., 1989, Plant Physiol. 91, 1575-1579; XU et al., 2003, Science in China Series C Vol.46 No.6, 561-569). Geeignete 20 Intronsequenzen sind beispielsweise das erste Intron des sh1-Gens aus Mais, das erste Intron des Poly-Ubiquitin Gens 1 aus Mais, das erste Intron des EPSPS Gens aus Reis oder eines der beiden ersten Introns des PAT1 Gens aus Arabidopsis.

Weiterhin können erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße 25 Pflanzen mittels der so genannten "in situ-Aktivierung", hergestellt werden. Die eingeführte genetische Modifikation bewirkt dabei eine Veränderung der regulatorischen Sequenzen endogener OK1 Gene und/oder R1 Gene, was zu einer verstärkten Expression von OK1 Genen und/oder R1 Genen führt. Bevorzugt geschieht die Aktivierung eines OK1 Gens und/oder eines R1 Gens durch „in vivo“ 30 Mutagenese eines Promotors oder von „enhancer“-Sequenzen eines endogenen OK1 Gens und/oder eines R1 Gens. Dabei kann z.B. ein Promotor oder eine „enhancer“-Sequenz durch Mutagenese derart verändert werden, dass die erzeugte

- Mutation in erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen zu einer erhöhten Expression eines OK1 Gens und/oder R1 Gens führt im Vergleich zur Expression eines OK1 Gens und/oder eines R1 Gens in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen. Die Mutation in einem Promotor oder einer „enhancer“-
- 5 Sequenz kann auch dazu führen, dass OK1 Gene und/oder R1 Gene in erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen zu einem Zeitpunkt exprimiert werden, zu welchem sie in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht exprimiert werden.
- 10 Unter dem Begriff „OK1 Gen“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Nucleinsäuremolekül (cDNA, DNA) verstanden werden, das ein OK1 Protein, vorzugsweise ein OK1 Protein aus Stärke speichernden Pflanzen besonders bevorzugt, aus *Arabidopsis thaliana*, insbesondere bevorzugt aus Reis, codiert.
- 15 Unter dem Begriff „R1 Gen“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Nucleinsäuremolekül (cDNA, DNA) verstanden werden, das ein R1 Protein, vorzugsweise ein R1 Protein aus Stärke speichernden Pflanzen besonders bevorzugt, aus *Arabidopsis thaliana*, insbesondere bevorzugt aus Reis, codiert.
- 20 Bei der so genannten "in vivo-Mutagenese" wird durch Transformation von Pflanzenzellen ein hybrides RNA-DNA-Oligonucleotid ("Chimeroplast") in Pflanzenzellen eingeführt (Kipp, P.B. et al., Poster Session beim " 5th International Congress of Plant Molecular Biology, 21.-27. September 1997, Singapore; R. A. Dixon und C.J. Arntzen, Meeting report zu "Metabolic Engineering in Transgenic
- 25 Plants", Keystone Symposia, Copper Mountain, CO, USA, TIBTECH 15, (1997), 441-447; internationale Patentanmeldung WO 9515972; Kren et al., Hepatology 25, (1997), 1462-1468; Cole-Strauss et al., Science 273, (1996), 1386-1389; Beetham et al., 1999, PNAS 96, 8774-8778).
- Ein Teil der DNA-Komponente des RNA-DNA-Oligonucleotids ist homolog zu einer
- 30 Nucleinsäuresequenz eines endogenen OK1 Gens und/oder R1 Gens, weist jedoch im Vergleich zur Nucleinsäuresequenz eines endogenen OK1 Gens und/oder R1

Gens eine Mutation auf oder enthält eine heterologe Region, die von den homologen Regionen umschlossen ist.

Durch Basenpaarung der homologen Regionen des RNA-DNA-Oligonucleotids und des endogenen Nukleinsäuremoleküls, gefolgt von homologer Rekombination, kann
5 die in der DNA-Komponente des RNA-DNA-Oligonucleotids enthaltene Mutation oder heterologe Region in das Genom einer Pflanzenzelle übertragen werden. Dies führt zu einer Erhöhung der Aktivität eines oder mehrerer OK1 Proteine.

Alle diese Methoden beruhen auf der Einführung eines fremden
10 Nucleinsäuremoleküls in das Genom einer Pflanzenzelle oder Pflanze und sind daher grundsätzlich zu Herstellung erfindungsgemäßer Pflanzenzellen und erfindungsgemäßer Pflanzen geeignet.

Es wurde überraschenderweise gefunden, dass erfindungsgemäße Pflanzenzellen
15 und erfindungsgemäße Pflanzen eine modifizierte Stärke synthetisieren im Vergleich zu Stärke von entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen.

Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und erfindungsgemäßen Pflanzen
20 synthetisieren eine modifizierte Stärke, die in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere dem Gehalt an Stärkephosphat und/oder der Phosphatverteilung im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist, so dass diese für spezielle Verwendungszwecke besser geeignet ist.

25

Da bisher keine Enzyme beschrieben sind, die ausschließlich P-Stärke phosphorylieren, war es bisher auch nicht möglich, den Gehalt an Stärkephosphat von bereits phosphorylierter-Stärke in Pflanzen über ein gewisses Maß hinaus zu steigern. Diese ist nun durch Verwendung eines Enzyms mit der Funktion eines OK1
30 Proteins oder durch die Bereitstellung eines Nucleinsäuremoleküls, das ein OK1 Protein codiert, zur genetischen Modifikation von Pflanzen möglich.

Auch die Phosphatverteilung in von Pflanzen synthetisierter Stärke war aus Mangel an zur Verfügung stehenden Mitteln bisher nicht möglich. Auch eine Veränderung des Phosphatverhältnisses in nativen Stärken ist nun durch die Bereitstellung von Enzymen mit der Funktion von OK1 Proteinen und der Bereitstellung von

5 Nucleinsäuremolekülen, die ein OK1 Protein codieren, durch die vorliegende Erfindung möglich.

Daher umfasst die vorliegende Erfindung auch erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren, im

10 Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen.

Der Begriff „modifizierte Stärke“ bedeutet in Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass die Stärke veränderte physiko-chemische Eigenschaften gegenüber

15 nicht modifizierter Stärke, erhältlich aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen aufweist.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung synthetisieren erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen eine Stärke, die

20 einen erhöhten Gehalt an Stärkephosphat und/oder eine veränderte Phosphatverteilung im Vergleich zu Stärke, isoliert aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen aufweist.

Unter dem Begriff „Phosphatverteilung“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden

25 Erfindung der Anteil des in C-2-Position, C-3-Position oder C-6-Position eines Glucosemoleküles gebundenen Stärkephosphates bezogen auf den Gesamtgehalt an Stärkephosphat von Stärke verstanden werden.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung synthetisieren

30 erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen eine Stärke, die ein verändertes Verhältnis von C-3-Phosphat zu C-6-Phosphat aufweist im Vergleich zu Stärke aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen. Bevorzugt sind dabei

Stärken, welche einen erhöhten Anteil von in C-3-Position gebundenem Stärkephosphat gegenüber von in C-6-Position gebundenem Stärkephosphat aufweisen im Vergleich zu Stärken aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen.

5

Unter dem Begriff „Verhältnis von C-3-Phosphat zu C-6-Phosphat“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung der Anteil an Stärkephosphat verstanden werden, zu welchem das jeweils in C-3-Position bzw. C-6-Position gebundene Stärkephosphat einer Stärke zu der Summe aus dem in C-3-Position und
10 in C-6-Position gebundenem Stärkephosphat (C-3-Position + C-6-Position) der betreffenden Stärke beiträgt.

Zur Bestimmung der Menge an Stärkephosphat sind verschiedene Methoden beschrieben. Bevorzugt kann die bei Ritte et al. (2000, Starch/Stärke 52, 179-185)
15 beschriebene Methode zur Bestimmung der Menge von Stärkephosphat verwendet werden. Besonders bevorzugt wird die Bestimmung der Menge an Stärkephosphat mittels ^{31}P -NMR nach der bei Kasemusuwan und Jane (1996, Cereal Chemistry 73, 702-707) beschriebenen Methode durchgeführt.

20 Ferner sind Gegenstand der Erfindung genetisch modifizierte Pflanzen, die erfindungsgemäße Pflanzenzellen enthalten. Derartige Pflanzen können durch Regeneration aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen erzeugt werden.

Bei den erfindungsgemäßen Pflanzen kann es sich prinzipiell um Pflanzen jeder
25 beliebigen Pflanzenspezies handeln, d.h. sowohl um monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Nutzpflanzen, d.h. Pflanzen, die vom Menschen kultiviert werden für Zwecke der Ernährung oder für technische, insbesondere industrielle Zwecke.

30 In einer weiteren Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Pflanze, eine stärkepeichernde Pflanze.

Der Begriff "Stärke speichernde Pflanzen" meint im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung alle Pflanzen mit Pflanzenteilen, die eine Speicherstärke enthalten, wie z.B. Mais, Reis, Weizen, Roggen, Hafer, Gerste, Maniok, Kartoffel, Sago, Mungbohne, Erbse, oder Sorghum.

5

Der Begriff „Kartoffelpflanze“ oder „Kartoffel“ meint im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Pflanzenspezies der Gattung *Solanum*, besonders Knollen produzierende Spezies der Gattung *Solanum* und insbesondere *Solanum tuberosum*.

- 10 Der Begriff „Weizenpflanze“ meint im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Pflanzenspezies der Gattung *Triticum* oder Pflanzen, die aus Kreuzungen mit Pflanzen der Gattung *Triticum* hervorgegangen sind, besonders in der Agrarwirtschaft zu kommerziellen Zwecken angebaute Pflanzenspezies der Gattung *Triticum* bzw. Pflanzen, die aus Kreuzungen mit Pflanzen der Gattung *Triticum*
15 hervorgegangen sind, insbesondere bevorzugt *Triticum aestivum*.

- Der Begriff „Maispflanze“ meint im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Pflanzenspezies der Gattung *Zea*, besonders in der Agrarwirtschaft zu kommerziellen Zwecken angebaute Pflanzenspezies der Gattung *Zea*, besonders
20 bevorzugt *Zea mais*.

- In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäße stärke-speichernde Pflanzen der (systematischen) Familie *Poaceae*. Bevorzugt handelt es sich dabei um Mais- oder Weizenpflanzen.
25

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Vermehrungsmaterial erfindungsgemäßer Pflanzen, enthaltend eine erfindungsgemäße Pflanzenzelle.

- Der Begriff „Vermehrungsmaterial“ umfasst dabei jene Bestandteile der Pflanze, die
30 geeignet sind zur Erzeugung von Nachkommen auf vegetativem oder sexuellem Weg. Für die vegetative Vermehrung eignen sich beispielsweise Stecklinge, Calluskulturen, Rhizome oder Knollen. Anderes Vermehrungsmaterial umfasst

beispielsweise Früchte, Samen, Sämlinge, Protoplasten, Zellkulturen, etc. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Vermehrungsmaterial um Knollen und besonders bevorzugt um endospermhaltige Körner.

- 5 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erntebare Pflanzenteile erfindungsgemäßer Pflanzen, wie Früchte, Speicherwurzeln, Wurzeln, Blüten, Knospen, Sprosse oder Stämme, vorzugsweise Samen, Körner oder Knollen, wobei diese erntebaren Teile erfindungsgemäße Pflanzenzellen enthalten.
- 10 Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze, worin
 - a) eine Pflanzenzelle genetisch modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der enzymatischen Aktivität eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-
15 Pflanzenzellen führt;
 - b) aus Pflanzenzellen von Schritt a) eine Pflanze regeneriert wird;
 - c) und gegebenenfalls weitere Pflanzen mit Hilfe der Pflanzen nach Schritt b) erzeugt werden.
- 20 Für die laut Schritt a) in die Pflanzenzelle eingeführte genetische Modifikation gilt, dass es sich grundsätzlich um jede Art von Modifikation handeln kann, die zur Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins führt. Die Regeneration der Pflanzen gemäß Schritt (b) kann nach dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen (z.B. beschrieben in „Plant Cell Culture Protocols“, 1999, ed. by
25 R.D. Hall, Humana Press, ISBN 0-89603-549-2).

Die Erzeugung weiterer Pflanzen gemäß Schritt (c) des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze kann z.B. erfolgen durch vegetative Vermehrung (beispielsweise über Stecklinge,

- 30 Knollen oder über Calluskultur und Regeneration ganzer Pflanzen) oder durch sexuelle Vermehrung. Die sexuelle Vermehrung findet dabei vorzugsweise kontrolliert statt, d.h. es werden ausgewählte Pflanzen mit bestimmten Eigenschaften

miteinander gekreuzt und vermehrt. Die Auswahl erfolgt dabei bevorzugt in der Weise, dass die weiteren Pflanzen, die nach Schritt c) erzeugt werden, die in Schritt a) eingeführte Modifikation aufweisen.

- 5 Die genetischen Modifikationen zur Erzeugung der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen können gleichzeitig oder in aufeinander folgenden Schritten erfolgen. Die genetische Modifikation kann dabei jede genetische Modifikation sein, die zur Erhöhung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins und/oder mindestens eines R1 Proteins führen. Es kann sowohl von Wildtyp-Pflanzen bzw. Wildtyp-
10 Pflanzenzellen ausgegangen werden, in denen noch keine vorherige genetische Modifikation zur Verringerung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins oder mindestens eines R1 Proteins erfolgt ist, oder von bereits genetisch modifizierten Pflanzenzellen bzw. Pflanzen, in denen bereits durch eine genetische Modifikation die Aktivität mindestens eines OK1 Proteins oder mindestens eines R1 Proteins
15 erhöht ist. Es ist unerheblich, ob für die genetische Modifikation, die zu einer erhöhten Aktivität eines OK1 Proteins führt, die gleiche Methode verwendet wird wie für die genetische Modifikation, die zu einer erhöhten Aktivität eines R1 Proteins führt, solange beide genetische Modifikationen zusammen zu einer erhöhten Aktivität eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins in derselben Pflanzenzelle führen.

20

- In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze besteht die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom der Pflanzenzelle, wobei das Vorhandensein
25 oder die Expression des/der fremden Nucleinsäuremoleküls/Nukleinsäuremoleküle zu einer erhöhten Aktivität eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins in der Zelle führt/führen.

- In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur
30 Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze besteht die genetische Modifikation in der Einführung von mindestens einem fremden Nucleinsäuremolekül in das Genom der Pflanzenzelle, wobei das/die fremde/fremden

Nucleinsäuremolekül/Nukleinsäuremoleküle ein OK1 Protein und/oder ein R1 Protein codierende Sequenzen enthalten.

Wie oben bereits für zur genetischen Modifikation in die Pflanzelle oder Pflanze
5 eingebrachten fremden Nukleinsäuremolekülen beschrieben, kann es sich in Schritt
a) des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen
genetisch modifizierten Pflanze um ein einzelnes Nucleinsäuremolekül oder um
mehrere Nucleinsäuremoleküle handeln. Die oben gemachten Ausführungen sind für
das hier beschriebene erfindungsgemäße Verfahren entsprechend anzuwenden.

10

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur
Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze besteht die
genetische Modifikation in Schritt a) des Verfahrens in der Einführung eines fremden
Nucleinsäuremoleküls, welches mindestens eine ein R1 Protein codierende Sequenz
15 und mindestens eine ein OK1 Protein codierende Sequenzen enthält.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur
Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze besteht die
genetische Modifikation in Schritt a) des Verfahrens in der Einführung mehrerer
20 fremder Nucleinsäuremoleküle, wobei mindestens ein erstes Nucleinsäuremolekül
eine ein R1 Protein codierende Sequenz enthält und mindestens ein zweites
Nucleinsäuremolekül eine ein OK1 Protein codierende Sequenzen enthält.

Weiterhin können zur Einführung eines fremden Nukleinsäuremoleküls bei der
25 Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren anstelle einer Wildtyp-Pflanzenzelle
bzw. Wildtyp-Pflanze, eine Mutantenzelle bzw. eine Mutante, die sich dadurch
auszeichnet, dass sie bereits eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins oder eine
erhöhte Aktivität eines R1 Proteins aufweist, verwendet werden. Die weiter oben
gemachten Angaben zur Verwendung von Mutanten für die Herstellung
30 erfindungsgemäßer Pflanzenzellen oder Pflanzen, sind hier entsprechend
anzuwenden.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze, ist mindestens ein fremdes Nucleinsäuremolekül ausgewählt, aus der Gruppe bestehend aus

- 5 a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein mit der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz codieren;
- b) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die Aminosäuresequenz umfasst, die von der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird;
- 10 c) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Aminosäuresequenz eine Identität von mindestens 60% zu der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz aufweisen;
- d) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Sequenz eine Identität von mindestens 60% zu der Aminosäuresequenz aufweist; die von der
15 Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder von der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird;
- e) Nucleinsäuremolekülen, die die unter SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleotidsequenz oder eine komplementäre Sequenz umfassen;
- f) Nucleinsäuremolekülen, die die Nucleotidsequenz der im Plasmid A.t.-OK1-
20 pGEM oder Plasmid pMI50 enthaltenen Insertion umfassen;
- g) Nucleinsäuremolekülen, welche zu den unter a), b), e) oder f) beschriebenen Nucleinsäuresequenzen eine Identität von mindestens 70% aufweisen;
- h) Nucleinsäuremolekülen, welche mit mindestens einem Strang der unter a), b), e) oder f) beschriebenen Nucleinsäuremolekülen unter stringenten
25 Bedingungen hybridisieren;
- i) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter a), b), e) oder f) genannten Nucleinsäuremoleküle abweicht; und
- j) Nucleinsäuremolekülen, die Fragmente, allelische Varianten und/oder Derivate
30 der unter a), b), c), d), e), f), g), h) oder i) genannten Nucleinsäuremoleküle darstellen.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze, codiert mindestens ein fremdes Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein aus Kartoffel, Weizen, Reis, Mais, Soyabohne, Citrus oder *Arabidopsis*. Referenzen für die genannten Nucleinsäuresequenzen codierend R1 Proteine aus den genannten Pflanzen sind bereits weiter oben angegeben.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze, worin

- 10 a) eine Pflanzenzelle genetisch modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der enzymatischen Aktivität eines OK1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen führt;
- b) aus Pflanzenzellen von Schritt a) eine Pflanze regeneriert wird;
- c) gegebenenfalls weitere Pflanzen mit Hilfe der Pflanzen nach Schritt b) erzeugt werden und
- 15 d) Pflanzen erhalten nach Schritt b) oder c) mit einer Pflanz gekreuzt werden, die eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität eines R1 Proteins aufweist, im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen.

20

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze, worin

- a) eine Pflanzenzelle genetisch modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der enzymatischen Aktivität eines R1 Proteins im Vergleich zu
- 25 entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen führt;
- b) aus Pflanzenzellen von Schritt a) eine Pflanze regeneriert wird;
- c) gegebenenfalls weitere Pflanzen mit Hilfe der Pflanzen nach Schritt b) erzeugt werden und
- d) Pflanzen erhalten nach Schritt b) oder c) mit einer Pflanze gekreuzt werden, die
- 30 eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität eines OK1 Proteins aufweist, im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen.

Dabei können die Pflanzen nach Schritt a) wie bereits oben beschrieben, genetisch modifiziert werden. Die Regeneration von Pflanzen nach Schritt b) und die Erzeugung weiterer Pflanzen nach Schritt c) wurden ebenfalls bereits weiter oben
5 dargestellt.

Eine Pflanze, die nach Schritt d) der beiden letztgenannten Ausführungsformen mit Pflanzen oder Nachkommen der Pflanzen, erhalten aus Schritt b) oder c), gekreuzt wird, kann jede Pflanze sein, die eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins bzw. eines R1 Proteins aufweist, im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen. Die
10 Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins bzw. eines R1 Proteins kann dabei durch jede Modifikation hervorgerufen sein, die zu einer Erhöhung der Aktivität der betreffenden Proteine in den entsprechenden Pflanzen führt. Es kann sich bei diesen Pflanzen um Mutanten oder mittels gentechnischer Methoden modifizierte Pflanzen handeln. Bei den Mutanten kann es sich sowohl um spontan (natürlich) auftretende
15 Mutanten, als auch um solche handeln, die durch den gezielten Einsatz von Mutagenen (wie z.B. chemische Agentien, ionisierende Strahlung) oder gentechnischen Verfahren (z.B. Transposon activation tagging, T-DNA activation tagging, *in vivo*-Mutagenese) erzeugt wurden. Bevorzugt handelt es sich bei den durch gentechnische Verfahren erzeugten Pflanzen um mittels Insertionsmutagenese
20 hergestellte Mutanten, besonders bevorzugt um genetisch modifizierte Pflanzen, die ein fremdes Nucleinsäuremolekül exprimieren, insbesondere bevorzugt um genetisch modifizierte Pflanzen, bei welchen das fremde Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein bzw. ein R1 Protein codiert.

25 In einer weiteren Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze zur Erzeugung von Stärke speichernden Pflanzen verwendet.

In einer weiteren Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren zur
30 Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze zur Erzeugung erfindungsgemäßer Mais- oder Weizenpflanzen verwendet.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze, worin die genetisch modifizierte Pflanze eine modifizierte Stärke synthetisiert im Vergleich zu Stärke aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-
5 Pflanzen.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze synthetisieren die erfindungsgemäßen Pflanzen eine modifizierte Stärke, die einen erhöhten Gehalt
10 an Stärkephosphat und/oder eine veränderte Phosphatverteilung im Vergleich zu Stärke, isoliert aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzen aufweist.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze synthetisieren
15 die erfindungsgemäßen Pflanzen eine modifizierte Stärke, die ein verändertes Verhältnis von C-3-Phosphat zu C-6-Phosphat aufweist im Vergleich zu Stärke aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen. Insbesondere bevorzugt sind dabei Stärken, welche einen erhöhten Anteil von in C-3-Position gebundenem
Stärkephosphat gegenüber von in C-6-Position gebundenem Stärkephosphat
20 aufweisen im Vergleich zu Stärke aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die durch erfindungsgemäße Verfahren erhältlichen Pflanzen.

25 Es wurde überraschenderweise gefunden, dass Stärke, isoliert aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und erfindungsgemäßen Pflanzen, die eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins und eine erhöhte Aktivität eines R1 Proteins aufweisen, eine modifizierte Stärke synthetisieren.

Insbesondere die erhöhten Mengen an Stärkephosphat erfindungsgemäßer Stärken
30 verleihen den Stärken überraschende und vorteilhafte Eigenschaften. Erfindungsgemäße Stärken tragen durch den erhöhten Anteil an Stärkephosphat einen erhöhten Anteil an geladenen Gruppen, die die funktionellen Eigenschaften der

Stärke wesentlich beeinflussen. Stärke, die geladene funktionelle Gruppen trägt, ist insbesondere in der Papierindustrie einsetzbar, wo sie für die Oberflächenbeschichtung (Coating) von Papier verwendet werden. Papier, welches mit geladenen Molekülen, die außerdem gute Klebeeigenschaften aufweisen, 5 beschichtet ist, eignet sich besonders für die Aufnahme von Farbstoffen, wie z.B. Tinte, Druckfarben etc..

Die vorliegende Erfindung betrifft auch modifizierte Stärken, erhältlich aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen, aus 10 erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial oder aus erfindungsgemäßen erntebaren Pflanzenteilen.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäß modifizierte Stärke aus stärke-speichernden Pflanzen, bevorzugt 15 aus Stärke speichernden Pflanzen der (systematischen) Familie *Poaceae*, besonders bevorzugt aus Mais- oder Weizenpflanzen.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke, umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer 20 erfindungsgemäßen Pflanzenzelle oder einer erfindungsgemäßen Pflanze, aus erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial einer solchen Pflanze und/oder aus erfindungsgemäßen erntebaren Pflanzenteilen einer solchen Pflanze, vorzugsweise aus erfindungsgemäßen Stärke speichernden Teilen einer solchen Pflanze. Vorzugsweise umfasst ein solches Verfahren auch den Schritt des Erntens der 25 kultivierten Pflanzen bzw. Pflanzenteile und/oder des Vermehrungsmaterials dieser Pflanzen vor der Extraktion der Stärke und besonders bevorzugt ferner den Schritt der Kultivierung erfindungsgemäßer Pflanzen vor dem Ernten.

Verfahren zur Extraktion der Stärke aus Pflanzen oder von Stärke speichernden 30 Teilen von Pflanzen sind dem Fachmann bekannt. Weiterhin sind Verfahren zur Extraktion der Stärke aus verschiedenen Stärke speichernde Pflanzen beschrieben, z. B. in *Starch: Chemistry and Technology* (Hrsg.: Whistler, BeMiller und Paschall

(1994), 2. Ausgabe, Academic Press Inc. London Ltd; ISBN 0-12-746270-8; siehe z.B. Kapitel XII, Seite 412-468: Mais und Sorghum Stärken: Herstellung; von Watson; Kapitel XIII, Seite 469-479: Tapioca, Arrowroot und Sago Stärken: Herstellung; von Corbishley und Miller; Kapitel XIV, Seite 479-490: Kartoffelstärke: Herstellung und
5 Verwendungen; von Mitch; Kapitel XV, Seite 491 bis 506: Weizenstärke: Herstellung, Modifizierung und Verwendungen; von Knight und Oson; und Kapitel XVI, Seite 507 bis 528: Reisstärke: Herstellung und Verwendungen; von Rohmer und Klem; Maisstärke: Eckhoff et al., Cereal Chem. 73 (1996), 54-57, die Extraktion von
10 milling" erreicht.). Vorrichtungen, die für gewöhnlich bei Verfahren zur Extraktion von Stärke von Pflanzenmaterial verwendet werden, sind Separatoren, Dekanter, Hydrocyclone, Sprühtrockner und Wirbelschichttrockner.

Unter dem Begriff „Stärke speichernde Teile“ sollen im Zusammenhang mit der
15 vorliegenden Erfindung solche Teile einer Pflanze verstanden werden, in welchen Stärke, im Gegensatz zu transitorischer Blattstärke, zur Überdauerung von längeren Zeiträumen als Depot gespeichert wird. Bevorzugte Stärke speichernde Pflanzenteile sind z.B. Knollen, Speicherwurzeln und Körner, besonders bevorzugt sind Körner enthaltend ein Endosperm, insbesondere bevorzugt sind Körner enthaltend ein
20 Endosperm von Mais- oder Weizenpflanzen.

Modifizierte Stärke, erhältlich nach einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung modifizierter Stärke, ist ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

25

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei den erfindungsgemäßen modifizierten Stärken um native Stärken.

Der Begriff „native Stärke“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden
30 Erfindung, dass die Stärke nach dem Fachmann bekannten Methoden aus erfindungsgemäßen Pflanzen, erfindungsgemäßem erntebaren Pflanzenteilen,

erfindungsgemäßen Stärke speichernden Teilen oder erfindungsgemäßem Vermehrungsmaterial von Pflanzen isoliert wird.

Weiterhin ist die Verwendung erfindungsgemäßer Pflanzenzellen oder
5 erfindungsgemäßer Pflanzen zur Herstellung einer modifizierten Stärke Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Dem Fachmann ist bekannt, dass die Eigenschaften von Stärke durch z.B. thermische, chemische, enzymatische oder mechanische Derivatisierung verändert
10 werden können. Derivatisierte Stärken sind für verschiedene Anwendungen im Nahrungsmittel- und/oder Nicht-Nahrungsmittelbereich besonders geeignet. Die erfindungsgemäßen Stärken sind als Ausgangssubstanz besser geeignet zur Herstellung von derivatisierten Stärken als herkömmliche Stärken, da sie durch den höheren Gehalt an Stärkephosphat einen höheren Anteil an reaktiven funktionalen
15 Gruppen aufweisen.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch Verfahren zur Herstellung einer derivatisierten Stärke, worin erfindungsgemäße modifizierte Stärke, nachträglich derivatisiert wird.
20

Unter dem Begriff „derivatisierte Stärke“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine erfindungsgemäße modifizierte Stärke verstanden werden, deren Eigenschaften nach der Isolierung aus pflanzlichen Zellen mit Hilfe von chemischen, enzymatischen, thermischen oder mechanischen Verfahren verändert wurde.
25

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei der erfindungsgemäßen derivatisierten Stärke um mit Hitze und/oder mit Säure behandelte Stärke.

30 In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um Stärkeether, insbesondere um Stärke-Alkylether, O-Allylether, Hydroxylalkylether, O-

Carboxylmethylether, stickstoffhaltige Stärkeether, phosphathaltige Stärkeether oder schwefelhaltige Stärkeether.

5 In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um vernetzte Stärken.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um Stärke-Pfropf-Polymerisate.

10 In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um oxidierte Stärken.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um Stärkeester, insbesondere um Stärkeester, die unter Verwendung von organischen
15 Säuren in die Stärke eingeführt wurden. Besonders bevorzugt handelt es sich um Phosphat-, Nitrat-, Sulfat-, Xanthat-, Acetat- oder Citratstärken.

Die erfindungsgemäßen derivatisierten Stärken eignen sich für verschiedene Verwendungen in der Pharmaindustrie, im Nahrungsmittel- und/oder Nicht-
20 Nahrungsmittelbereich. Methoden zur Herstellung von erfindungsgemäßen derivatisierten Stärken sind dem Fachmann bekannt und in der allgemeinen Literatur ausreichend beschrieben. Eine Übersicht zur Herstellung von derivatisierten Stärken findet sich z.B. bei Orthoefer (in Corn, Chemistry and Technology, 1987, eds. Watson und Ramstad, Chapter 16, 479-499).

25

Derivatisierte Stärke, erhältlich nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung einer derivatisierten Stärke ist ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

30 Ferner ist die Verwendung erfindungsgemäßer modifizierter Stärken zur Herstellung von derivatisierter Stärke Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Stärke speichernde Teile von Pflanzen werden oft zu Mehlen verarbeitet. Beispiele für Teile von Pflanzen, aus welchen Mehle hergestellt werden, sind z.B. Knollen von Kartoffelpflanzen und Körner von Getreidepflanzen. Zur Herstellung von Mehlen aus Getreidepflanzen werden die endospermhaltigen Körner dieser Pflanzen gemahlen und gesiebt. Stärke ist ein Hauptbestandteil des Endosperms. Bei anderen Pflanzen, die kein Endosperm, sondern andere Stärke speichernde Teile, wie z.B. Knollen oder Wurzeln enthalten, wird Mehl häufig durch Zerkleinern, Trocknen und anschließendem Mahlen der betreffenden Speicherorgane hergestellt. Die Stärke des Endosperms oder enthaltend in Stärke speichernden Teilen von Pflanzen ist ein wesentlicher Anteil des Mehls, welches aus den betreffenden Pflanzenteilen hergestellt wird. Die Eigenschaften von Mehlen werden daher auch durch die in dem betreffenden Mehl vorliegende Stärke beeinflusst. Erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen synthetisieren eine veränderte Stärke im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen. Mehle, hergestellt aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, erfindungsgemäßen Pflanzen, erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial oder erfindungsgemäßen erntebaren Teilen weisen daher veränderte Eigenschaften auf. Die Eigenschaften von Mehlen können auch durch Mischen von Stärke mit Mehlen oder durch das Mischen von Mehlen mit unterschiedlichen Eigenschaften beeinflusst werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft daher Mehle, enthaltend eine erfindungsgemäße Stärke.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft Mehle, die aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, erfindungsgemäßen Pflanzen, Stärke speichernden Teilen erfindungsgemäßer Pflanzen, aus erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial oder aus erfindungsgemäßen erntebaren Pflanzenteilen hergestellt sind. Bevorzugte Stärke speichernde Teile erfindungsgemäßer Pflanzen sind Knollen, Speicherwurzeln und ein Endosperm enthaltende Körner. Vorzugsweise stammen Knollen von Kartoffelpflanzen und Körner von Pflanzen der

(systematischen) Familie *Poaceae*, besonders bevorzugt stammen Körner von Mais- oder Weizenpflanzen.

Unter dem Begriff „Mehl“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein
5 durch Mahlen von Pflanzenteilen erhaltenes Pulver verstanden werden. Gegebenenfalls werden Pflanzenteile vor dem Mahlen getrocknet und nach dem Mahlen zerkleinert und/oder gesiebt.

Erfindungsgemäße Mehle zeichnen sich auf Grund der in ihnen vorliegenden Stärke,
10 die einen veränderten Phosphatgehalt und/oder eine veränderte Phosphatverteilung aufweisen insbesondere durch ihr erhöhtes Wasserbindevermögen aus. Diese ist z.B. bei der Verarbeitung von Mehlen in der Lebensmittelindustrie für viele Anwendungen, insbesondere bei der Herstellung von Backwaren gewünscht.

15 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Verfahren zur Herstellung von Mehlen, umfassend den Schritt des Mahlens von erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, erfindungsgemäßen Pflanzen, von Teilen erfindungsgemäßer Pflanzen, Stärke speichernden Teilen von erfindungsgemäßen Pflanzen, erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial oder erfindungsgemäßigem
20 erntebarem Material.

Mehle können durch Mahlen von Stärke speichernden Teilen von erfindungsgemäßen hergestellt werden. Dem Fachmann ist bekannt, wie er Mehle herstellt. Vorzugsweise umfasst ein Verfahren zur Herstellung von Mehlen auch den
25 Schritt des Erntens der kultivierten Pflanzen bzw. Pflanzenteile und/oder des Vermehrungsmaterials bzw. der Stärke speichernden Teile dieser Pflanzen vor dem Mahlen und besonders bevorzugt ferner den Schritt der Kultivierung erfindungsgemäßer Pflanzen vor dem Ernten.

30 Unter dem Begriff „Teile von Pflanzen“ sollen im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung alle Teile einer Pflanze verstanden werden, die als Bestandteile in ihrer Gesamtheit eine vollständige Pflanze darstellen. Teile von

Pflanzen sind z.B. Sprosse, Blätter, Rhizome, Wurzeln, Rüben, Knollen, Schoten, Samen oder Körner.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst das
5 Verfahren zur Herstellung von Mehlen eine Prozessierung von erfindungsgemäßen Pflanzen, von Stärke speichernden Teilen erfindungsgemäßer Pflanzen, von erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial oder von erfindungsgemäßigem erntebarem Material vor dem Mahlen.

Die Prozessierung kann dabei z.B. eine Hitzebehandlung und/oder eine Trocknung
10 sein. Hitzebehandlung gefolgt von einer Trocknung des Hitze behandelten Materials wird z.B. bei der Herstellung von Mehlen aus Speicherwurzeln oder Knollen wie z.B. aus Kartoffelknollen angewendet, bevor die das Mahlen erfolgt. Die Zerkleinerung von erfindungsgemäßen Pflanzen, von Stärke speichernden Teilen erfindungsgemäßer Pflanzen, von erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial oder
15 von erfindungsgemäßigem erntebarem Material vor dem Mahlen kann ebenfalls eine Prozessierung im Sinne der vorliegenden Erfindung darstellen. Die Entfernung von pflanzlichem Gewebe, wie z.B. von Spelzen der Körner, vor dem Mahlen stellt auch eine Prozessierung vor dem Mahlen in Sinne der vorliegenden Erfindung dar.

20 In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst das Verfahren zur Herstellung von Mehlen nach dem Mahlen eine Prozessierung des Mahlgutes.

Das Mahlgut kann dabei z.B. nach dem Mahlen gesiebt werden, um z.B. verschiedene Typenmehle herzustellen.

25

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanzenzellen, erfindungsgemäßen Pflanzen, von Teilen erfindungsgemäßer Pflanzen, Stärke speichernden Teilen von erfindungsgemäßen Pflanzen, erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial oder
30 erfindungsgemäßigem erntebarem Material zur Herstellung von Mehlen.

Es ist auch Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Mittel, wie z.B. DNA Moleküle zur Erzeugung von erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und erfindungsgemäßen Pflanzen, die im Vergleich zu nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen eine modifizierte Stärke synthetisieren, zur Verfügung zu stellen. Die zur Verfügung gestellten DNA Moleküle beinhalten Nucleinsäuresequenzen, welche ein OK1 Protein codieren. Ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines OK1 Proteins war dem Fachmann bisher nicht bekannt. Daher konnten auch keine DNA Moleküle zur Verfügung gestellt werden, die es erlauben, erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen und die von ihnen synthetisierte Stärke bzw. die aus ihnen gewonnenen Mehle zu erzeugen.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül enthaltend eine Nucleinsäuresequenz codierend ein OK1 Protein und eine Nucleinsäuresequenz codierend ein R1 Protein.

Unter dem Begriff „rekombinantes Nukleinsäuremolekül“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Nukleinsäuremolekül verstanden werden, welches sowohl Nucleinsäuresequenzen codierend ein OK1 Protein, als auch Nucleinsäuresequenzen codierend ein R1 Protein, enthält und bei welchem die Nucleinsäuresequenzen codierend ein OK1 Protein und ein R1 Protein in einer Anordnung vorliegen, wie sie natürlicherweise im Genom eines Organismus nicht vorliegen. Neben Nucleinsäuresequenzen codierend ein OK1 Protein und Nucleinsäuresequenzen codierend ein R1 Protein kann das rekombinante Nucleinsäuremolekül noch zusätzliche Sequenzen enthalten, welche natürlicherweise nicht in einer solchen Anordnung vorliegen, wie sie in erfindungsgemäßen rekombinanten Nucleinsäuremolekülen vorliegen. Die genannten zusätzlichen Sequenzen können dabei beliebige Sequenzen sein, bevorzugt handelt es sich dabei um regulatorische Sequenzen (Promotoren, Terminationssignale, Enhancer), besonders bevorzugt um regulatorische Sequenzen, die in pflanzlichem Gewebe aktiv sind, besonders bevorzugt um regulatorische Sequenzen die in Stärke speicherndem pflanzlichem Gewebe aktiv

sind. Methoden zur Erzeugung erfindungsgemäßer rekombinanter Nucleinsäuremoleküle sind dem Fachmann bekannt und umfassen gentechnische Methoden wie z.B. die Verbindung von Nucleinsäuremolekülen durch Ligation, genetische Rekombination oder die Neusynthese von Nucleinsäuremolekülen (siehe 5 z.B. Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd edition (2001) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. ISBN: 0879695773; Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons; 5th edition (2002), ISBN: 0471250929).

10 Eine weitere Ausführungsform von erfindungsgemäßen rekombinanten Nucleinsäuremolekülen der vorliegenden Erfindung betreffen Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren, Bacteriophagen und andere in der Gentechnik gängige Vektoren, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle enthalten.

15

In einer weiteren Ausführungsform sind die in den Vektoren enthaltenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle verknüpft mit regulatorischen Sequenzen, die die Expression in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen initiieren. Der Begriff "Expression" kann dabei Transkription als auch Transkription und Translation 20 bedeuten. Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können dabei zu den regulatorischen Sequenzen in „sense“-Orientierung, und/oder in „antisense“-Orientierung vorliegen. Die erfindungsgemäßen rekombinanten Nucleinsäuremoleküle können dabei gemeinsam unter der Kontrolle eines einzigen regulatorischen Elementes stehen, oder sie können jeweils ein eigenes 25 regulatorisches Element aufweisen.

Regulatorische Sequenzen zur Expression in prokaryontischen Organismen, z.B. *E. coli*, und in eukaryontischen Organismen sind ausreichend in der Literatur beschrieben, insbesondere solche zur Expression in Hefe, wie z. B. *Saccharomyces* 30 *cerevisiae*. Eine Übersicht verschiedener Systeme zur Expression für Proteine in verschiedenen Wirtsorganismen findet man z. B. in *Methods in Enzymology* 153 (1987), 383-516 und in Bitter et al. (*Methods in Enzymology* 153 (1987), 516-544).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, insbesondere eine prokaryontische oder eukaryontische Zelle, die genetisch modifiziert ist mit einem erfindungsgemäßen rekombinanten Nucleinsäuremolekül
5 und/oder mit einem erfindungsgemäßen Vektor, sowie Zellen, die von derartigen Wirtszellen abstammen und die die erfindungsgemäße genetische Modifikation enthalten.

10 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Wirtszellen, insbesondere prokaryontische oder eukaryontische Zellen, die mit einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül oder einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert wurden, sowie Wirtszellen, die von derartigen Wirtszellen abstammen und die beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Vektoren enthalten.

15 Die Wirtszellen können Bakterien- (z.B. *E. coli*, Bakterien der Gattung *Agrobacterium* insbesondere *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes*) oder Pilzzellen (z.B. Hefe, insbesondere *S. cerevisiae*, *Agaricus*, insbesondere *Agaricus bisporus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*), sowie pflanzliche oder tierische Zellen sein. Der Begriff "transformiert" bedeutet dabei, dass die erfindungsgemäßen Zellen mit einem
20 erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül genetisch modifiziert sind insofern, als sie zusätzlich zu ihrem natürlichen Genom mindestens ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül enthalten. Dieses kann in der Zelle frei, gegebenenfalls als selbstreplizierendes Molekül, vorliegen oder es kann stabil in das Genom der Wirtszelle integriert vorliegen.

25 Vorzugsweise sind die Wirtszellen Mikroorganismen. Darunter werden im Rahmen der vorliegenden Anmeldung alle Bakterien und alle Protisten (z. B. Pilze, insbesondere Hefen und Algen) verstanden, so wie sie z. B. in Schlegel "Allgemeine Mikrobiologie" (Georg Thieme Verlag (1985), 1-2) definiert sind.

30 Bevorzugt sind die erfindungsgemäßen Wirtszellen Pflanzenzellen. Dabei kann es sich prinzipiell um Pflanzenzellen aus jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d.h. sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um

Pflanzenzellen aus landwirtschaftlichen Nutzpflanzen, d.h. aus Pflanzen, die vom Menschen kultiviert werden für Zwecke der Ernährung oder für technische, insbesondere industrielle Zwecke. Vorzugsweise betrifft die Erfindung Pflanzenzellen und Pflanzen aus Stärke speichernden Pflanzen (Mais, Reis, Weizen, Roggen, 5 Hafer, Gerste, Mariok, Kartoffel, Sago, Mungbohne, Erbse oder Sorghum), bevorzugt Pflanzenzellen aus Pflanzen der (systematischen) Familie *Poacea*, insbesondere besonders bevorzugt sind Pflanzenzellen aus Mais- oder Weizenpflanzen.

- 10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Zusammensetzungen enthaltend ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nucleinsäuremolekül, oder einen erfindungsgemäßen Vektor. Bevorzugt sind erfindungsgemäße Zusammensetzungen, enthaltend ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nucleinsäuremolekül oder einen erfindungsgemäßen Vektor und eine Wirtszelle.
- 15 Besonders bevorzugt handelt es sich bei der Wirtszelle um eine Pflanzenzelle, insbesondere bevorzugt um eine Zelle einer Mais- oder Weizenpflanze.

- Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft eine Zusammensetzung, enthaltend eine Nucleinsäuresequenz codierend ein OK1 Protein und eine
- 20 Nucleinsäuresequenz codierend ein R1 Protein.

Die Nucleinsäuresequenzen codierend ein OK1 Protein bzw. codierend ein R1 Protein können dabei zusammen auf einem einzigen Nucleinsäuremolekül, oder auf voneinander getrennten Nucleinsäuremolekülen vorliegen.

- 25 Ein weiterer Aspekt erfindungsgemäßer Zusammensetzungen betrifft Zusammensetzungen, die zur Erzeugung von erfindungsgemäßen Wirtszellen, bevorzugt zur Erzeugung erfindungsgemäßer Pflanzenzellen verwendet werden können. Bevorzugt handelt es sich hierbei um eine Zusammensetzung, enthaltend Nucleinsäuresequenzen codierend ein OK1 Protein und Nucleinsäuresequenzen
- 30 codierend ein R1 Protein, ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nucleinsäuremolekül oder einen erfindungsgemäßen Vektor und einen biolistischen Träger, welcher zur Einführung von Nucleinsäuremolekülen in eine Wirtszelle

geeignet ist. Bevorzugte biolistische Träger sind Partikel aus Wolfram, Gold oder Kunststoffen.

Eine weitere Ausführungsform erfindungsgemäßer Zusammensetzungen betrifft
5 Zusammensetzungen enthaltend Nucleinsäuresequenzen codierend ein OK1 Protein
und Nucleinsäuresequenzen codierend ein R1 Protein, ein erfindungsgemäßes
rekombinantes Nucleinsäuremolekül oder einen erfindungsgemäßen Vektor und eine
Pflanzenzelle und ein synthetisches Kulturmedium. Bevorzugt enthalten solche
Zusammensetzungen zusätzlich zu Pflanzenzellen und synthetischem Kulturmedium
10 auch Polyethylenglykol (PEG). Bei diesen Zusammensetzungen liegt das
erfindungsgemäße rekombinante Nucleinsäuremolekül außerhalb der Pflanzenzelle
vor, d.h. es befindet sich außerhalb des von einer Cytoplasmamembran
umschlossenen Zellinneren der Pflanzenzelle.

Synthetische Kulturmedien, die zur Kultivierung und/oder zur Transformation von
15 Pflanzenzellen geeignet sind, sind dem Fachmann bekannt und z.B. ausreichend in
der Literatur beschrieben. Viele unterschiedliche synthetische Kulturmedien sind
auch im Fachhandel käuflich erwerbbar (z.B. DUCHEFA Biochemie B.V., Belgien).

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung erfindungsgemäßer
20 Zusammensetzungen zur Transformation von Pflanzenzellen.

Beschreibung der Sequenzen

- SEQ ID NO 1: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region eines A.t.-OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana*. Diese Sequenz ist den Vektoren OK1-pGEM-T und OK1-pDEST™17 und inseriert.
- 5 SEQ ID NO 2: Aminosäuresequenz codierend ein A.t.-OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana*. Diese Sequenz ist von der unter SEQ ID NO 1 dargestellten Nucleinsäuresequenz ableitbar.
- SEQ ID NO 3: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region eines O.s.-OK1 Proteins aus *Oryza sativa*. Diese Sequenz ist dem Vektor pMI50
10 inseriert.
- SEQ ID NO 4: Aminosäuresequenz codierend ein O.s.-OK1 Protein aus *Oryza sativa*. Diese Sequenz ist von der unter SEQ ID NO 3 dargestellten Nucleinsäuresequenz ableitbar.
- SEQ ID NO 5: Peptidsequenz codierend die Phosphohistidindomäne der OK1
15 Proteine aus *Arabidopsis thaliana*, und *Oryza sativa*.
- SEQ ID NO 6: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region eines C.r.-R1 Proteins aus *Citrus reticulata*.
- SEQ ID NO 7: Aminosäuresequenz codierend ein C.r.-R1 Protein aus *Citrus reticulata*.
- 20 SEQ ID NO 8: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region eines A.t.-R1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana*.
- SEQ ID NO 9: Aminosäuresequenz codierend ein A.t.-R1 Protein aus *Arabidopsis thaliana*.
- SEQ ID NO 10: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region eines
25 S.t.-R1 Proteins aus *Solanum tuberosum*.
- SEQ ID NO 11: Aminosäuresequenz codierend ein S.t.-R1 Protein aus *Solanum tuberosum*.
- SEQ ID NO 12: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region eines O.s.-R1 Proteins aus *Oryza sativa*.
- 30 SEQ ID NO 13: Aminosäuresequenz codierend ein O.s.-R1 Protein aus *Oryza sativa*

SEQ ID NO 14: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region eines G.m.-R1 Proteins aus *Glycine max*.

SEQ ID NO 15: Aminosäuresequenz codierend das S.t.-R1 Protein aus *Glycine max*.

5 SEQ ID NO 16: Nucleinsäuresequenz enthaltend eine codierende Region eines Z.m.-R1 Proteins aus *Zea mays*.

SEQ ID NO 17: Aminosäuresequenz codierend ein Z.m.-R1 Protein aus *Zea mays*.

10

Beschreibung der Abbildungen

Fig. 1: Denaturierendes Acrylamidgel zur Identifizierung von Proteinen aus *Arabidopsis thaliana*, die bevorzugt an nicht-phosphorylierte-Stärke im Vergleich zu phosphorylierter-Stärke binden. In Spur „M“ ist ein Standard Protein Molekulargewichtsmarker aufgetragen. In Spur „-“ sind Proteine, erhalten nach Inkubation des Kontrollansatzes C aus Beispiel 1 d) aufgetragen. In Spur „K“ sind Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Inkubation mit nicht-phosphorylierter-Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante (Ansatz B, Beispiel 1 d)), aufgetragen. In Spur „P“ sind Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Inkubation mit Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, die nachträglich *in vitro* mit einem R1 Protein phosphoryliert wurde (Ansatz A, Beispiel 1 d)) aufgetragen. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Acrylamidgel mit Comassie Blau gefärbt.

25

Fig. 2: Nachweis der Autophosphorylierung des OK1 Proteins. Fig. 2 A) stellt ein nach erfolgter Elektrophorese mit Comassie Blau gefärbtes denaturierendes (SDS) Acrylamidgel dar. Fig. 2 B) zeigt die Autoradiographie eines denaturierenden (SDS) Acrylamidgels. Auf beide Gele wurden jeweils die gleichen Proben zu gleichen Mengen aufgetragen. M: Standard Protein Molekulargewichtsmarker; R1: Probe aus Reaktionsgefäß 1 nach Beispiel 7

30

(nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP); R2: Probe aus Reaktionsgefäß 2 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP wurde das Protein auf 95°C erhitzt); R3: Probe aus Reaktionsgefäß 3 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP wurde das Protein in 0,5 M HCl inkubiert); R4: Probe aus Reaktionsgefäß 4 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP wurde das Protein mit 0,5 M NaOH inkubiert).

Fig. 3: Nachweis der Stärke phosphorylierenden Aktivität eines OK1 Proteins (siehe Beispiel 6). OK1 Protein wurde mit nicht-phosphorylierter-Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante (Ansatz A) und Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, die nachträglich *in vitro* mit einem R1 Protein phosphoryliert wurde (Ansatz B) inkubiert. Ansatz C entspricht Ansatz B, außer dass dieser Ansatz C ohne OK1 Protein inkubiert wurde. Für jeden Ansatz (A, B, C) wurden je zwei unabhängige Versuche durchgeführt (Versuch 1 und Versuch 2). Graphisch dargestellt sind die jeweiligen Mengen, gemessen in cpm (Counts per minute), an ³³P markiertem Phosphat, welches von dem OK1 Protein in nicht-phosphorylierte-Stärke (Ansatz A) und phosphorylierte Stärke (Ansatz B) eingeführt wurde.

Fig. 4: Vergleich der C-Atom-Positionen von Glucosemolekülen der Stärke, die von einem R1 Protein bzw. einem OK1 Protein phosphoryliert werden (siehe Beispiel 9). OK1 Protein (Ansatz A) wurde in Anwesenheit von mit ³³P markierten ATP mit Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, die nachträglich *in vitro* mit einem R1 Protein phosphoryliert wurde, inkubiert. R1 Protein (Ansatz B) wurde in Anwesenheit von mit ³³P markierten ATP mit Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde eine Totalhydrolyse der Stärke durchgeführt und die erhaltenen Hydrolyseprodukte mittels HPAE Chromatographie aufgetrennt. Als Standard wurden den Hydrolyseprodukten vor der Auftrennung Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat zugegeben. Die mittels HPAE Chromatographie aufgetrennten Hydrolyseprodukte wurden in einzelnen Fraktionen aufgesammelt. Mit Fraktion 15 eluierte das zugegebene

Glucose-6-Phosphat und mit Fraktion 17 das zugegebene Glucose-3-Phosphat. Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend auf das Vorliegen von radioaktiv markiertem Phosphat hin untersucht. Die in den einzelnen Fraktionen gemessene Menge an ^{33}P markiertem Phosphat, gemessen in cpm (Counts per minute), welches von dem OK1 Protein oder dem R1 Protein jeweils in die Hydrolyseprodukte der phosphorylierten-Stärke eingeführt wurde, ist graphisch dargestellt.

Fig. 5 Nachweis der Autophosphorylierung des OK1 Proteins. Fig. 5 A) stellt einen Western Blot dar. Fig. 5 B) zeigt die Autoradiographie eines denaturierenden (SDS) Acrylamidgels. Auf beide Gele wurden jeweils die gleichen Proben zu gleichen Mengen aufgetragen. Das OK1 Protein wurde entweder mit randomisiertem radioaktiv markiertem ATP oder mit spezifisch in gamma-Position radioaktiv markiertem ATP inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Proteine entweder auf 30°C oder 95°C erhitzt, oder in 0,5 M NaOH bzw. 0,5 M HCl inkubiert.

Fig. 6 Nachweis der Übertragung des beta-Phosphatrestes von ATP auf Stärke in einer von einem OK1 Protein katalysierten Reaktion. Es wurde zur Phosphorylierung von mittels eines R1 Proteins *in vitro* phosphorylierter Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, durch ein OK1 Protein entweder spezifisch in gamma-Position mit ^{33}P markiertes ATP oder randomisiertes ^{33}P ATP eingesetzt. In den jeweiligen mit „control“ bezeichneten Experimenten wurde kein OK1 Protein zugegeben. Jeder Versuchsansatz wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Ergebnisse beider Versuche sind dargestellt.

Allgemeine Methoden

30

Im Folgenden werden Methoden beschrieben, welche zur Durchführung der erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können. Diese Methoden stellen

konkrete Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dar, beschränken die vorliegende Erfindung jedoch nicht auf diese Methoden. Dem Fachmann ist bekannt, dass er durch Modifikation der beschriebenen Methoden und/oder durch Ersetzen einzelner Methodenteile durch alternative Methodenteile die Erfindung in gleicher
5 Weise ausführen kann.

1. Herstellung von Proteinextrakten aus pflanzlichen Geweben

a) Herstellung von Proteinextrakten aus pflanzlichen Geweben

Blattmaterial wird sofort nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren und
10 daraufhin im Mörser unter flüssigem Stickstoff homogenisiert. Das zerkleinerte Blattmaterial wird mit dem ca. 3,5-fachen Volumen (bezogen auf das Gewicht des eingesetzten Blattmaterials) kaltem (4°C) Bindungspuffer versetzt und für 2x 10 s mit einem Ultraturrax (maximale Geschwindigkeit) aufgeschlossen. Nach der ersten Behandlung mit einem Ultraturrax wird das zerkleinerte Blattmaterial auf Eis
15 abgekühlt, bevor die zweite Behandlung erfolgt. Anschließend wird das behandelte Blattmaterial durch ein 100 µm Nylonnetz gegeben und 20 min zentrifugiert (50 ml Zentrifugengefäß, 20.000xg, 4°C).

b) Ausfällen der in den Proteinextrakten enthaltenen Proteine

20 Der nach Zentrifugation nach Schritt a) erhaltene Überstand wird abgenommen und sein Volumen bestimmt. Für das Ausfällen von Proteinen wird Ammoniumsulfat über einen Zeitraum von 30 Minuten kontinuierlich unter Rühren auf Eis bis zu einer Endkonzentration von 75% (Gewicht/Volumen) dem Überstand zugegeben. Anschließend wird der Überstand für eine weitere Stunde auf Eis unter Rühren
25 inkubiert. Die aus dem Überstand ausgefällten Proteine werden bei 20.000xg und 4°C für 10 min pelletiert und das Pellet anschließend in 5 ml Bindungspuffer aufgenommen, d.h. die im Pellet vorliegenden Proteine werden in Lösung gebracht.

c) Entsalzen der ausgefällten Proteine

30 Die gelösten Proteine werden mittels einer mit Sephadex G25 gefüllten PD10-Säule (Amersham Bioscience, Freiburg, Prod. Nr. Säulen: 17-0851-01, Prod. Nr. Sephadex

G25-M: 17-0033-01) bei einer Temperatur von 4°C entsalzt, d.h. auch das zur Ausfällung unter Schritt b) verwendete Ammoniumsulfat wird von den gelösten Proteinen abgetrennt. Die PD10-Säule wird vor dem Auftragen der nach Schritt b) in Lösung gebrachten Proteine mit Bindungspuffer äquilibriert. Dazu werden fünfmal
5 jeweils 5 ml Bindungspuffer über die Säule gegeben. Anschließend werden pro Säule 2,5 ml der nach Schritt b) erhaltenen Proteinlösung auf die Säule gegeben, bevor Proteine mit 3,5 ml Bindungspuffer von der Säule eluiert werden.

d) Bestimmung der Proteinkonzentration

- 10 Die Proteinkonzentration wird mit einem Bradford-Essay (Biorad, München, Prod. Nr. 500-0006 bestimmt (**Bradford, 1976, Anal. Biochem. 72, 248-254**).

e) Zusammensetzung des Bindungspuffers [

	Bindungspuffer:	50 mM	HEPES/NaOH (od. KOH), pH 7.2
15		1 mM	EDTA
		2 mM	Dithioerythritol (DTE)
		2 mM	Benzamidin
		2 mM	ε-Aminocaprinsäure
		0.5 mM	PMSF
20		0.02 %	Triton X-100

2. Isolierung von Blattstärke

a) Isolierung von Stärkegranula aus pflanzlichen Geweben

- Blattmaterial wird sofort nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Blattmaterial wird im Mörser portionsweise unter flüssigem Stickstoff homogenisiert
25 und in insgesamt dem ca. 2,5-fachen Volumen (Gewicht/Volumen) Stärkepuffer aufgenommen. Diese Suspension wird zusätzlich noch einmal im Waring Blendor für 20 s bei maximaler Geschwindigkeit homogenisiert. Das Homogenisat wird durch ein Nylonnetz (100 µm Maschenweite) gegeben und 5 Minuten bei 1.000xg zentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wird verworfen.

30

b) Reinigung der Stärke, isoliert aus pflanzlichen Geweben

Das nach Schritt a) erhaltene Stärke enthaltende Pellet wird nach Entfernen des auf der Stärke oben aufliegenden grünen Materials durch abspülen des grünen Materials mit Stärkepuffer in Stärkepuffer aufgenommen und sukzessive durch Nylonnetze unterschiedlicher Maschenweite (in der Reihenfolge 60 µm, 30 µm, 20 µm) gegeben.

- 5 Das Filtrat wird über ein 10 ml Percoll-Kissen (95% (v/v) Percoll (Pharmacia, Uppsala, Schweden), 5% (v/v) 0,5M HEPES-KOH pH7,2) zentrifugiert (Correx-Röhrchen, 15 min, 2.000xg) zentrifugiert. Das nach dieser Zentrifugation erhaltene Sediment wird einmal in Stärkepuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 min, 1.000xg,).

10

c) Entfernen der an die Stärke gebundenen Proteine

Nach Schritt b) werden Stärkegranula erhalten, welche an Stärke bindende Proteine enthalten. Die an die Oberfläche der Stärkegranula gebundenen Proteine werden durch viermalige Inkubation mit 0,5 % SDS (Natriumlaurylsulfat) für jeweils 10-15

15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln entfernt. Nach jedem Waschschrift erfolgt dabei ein Zentrifugation (5 min, 5.000xg), um die Stärkegranula vom betreffenden Waschpuffer abzutrennen.

d) Reinigung von Proteinen befreiter Stärke

- 20 Die nach Schritt c) erhaltene, von an ihre Oberfläche bindenden Proteinen befreiten Stärke, wird anschließend durch viermaliges Inkubieren mit Waschpuffer für jeweils 10-15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln entfernt. Nach jedem Waschschrift erfolgt dabei eine Zentrifugation (5 min, 1.000xg), um die Stärkegranula vom betreffenden Waschpuffer abzutrennen. Diese Reinigungsschritte dienen vor
- 25 allem der Entfernung des bei Inkubationen nach Schritt c) eingesetzten SDS.

e) Bestimmung der Konzentration von isolierter Stärke

- Die Menge der Stärke, isoliert nach Schritt d) wird photometrisch bestimmt. Die optische Dichte der Stärkesuspension wird nach geeigneter Verdünnung gegen eine
- 30 Eichgerade bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Der lineare Bereich der Eichgerade befindet sich zwischen 0 und 0,3 Extinktionseinheiten.

Zur Erstellung der Eichgeraden wird Stärke, z.B. isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante unter Vakuum getrocknet, gewogen und in einem definierten Volumen Wasser aufgenommen. Die so erhaltene Suspension wird in mehreren Schritten jeweils im Verhältnis 1 zu 1 mit Wasser verdünnt, bis man eine
5 Suspension von ca. 5 µg Stärke pro ml Wasser enthält. Die durch die einzelnen Verdünnungsschritte erhaltenen Suspensionen werden im Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm vermessen. Die für die jeweiligen Suspensionen erhaltenen Absorptionswerte werden gegen die in der jeweiligen Suspension vorliegende Konzentration der Stärke aufgetragen. Die erhaltene Eichgerade sollte in dem
10 Bereich von 0 µg Stärke pro ml Wasser bis 0,3 µg Stärke pro ml Wasser einer linearen mathematischen Funktion folgen.

f) Aufbewahrung isolierter Stärke

Die Stärke kann entweder direkt, ohne weitere Lagerung für weitere Versuche
15 verwendet werden, oder in Aliquots in 1,5 mL Eppendorfgefäßen bei -20°C gelagert werden. Sowohl die eingefrorene Stärke, als auch nicht gelagerte, frisch isolierte Stärke kann gegebenenfalls z.B. für die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Methoden betreffend *in vitro*-Phosphorylierung und/oder Bindungstest eingesetzt werden.

20

g) Zusammensetzung von verwendeten Puffern

1x Stärkepuffer: 20 mM HEPES-KOH, pH 8.0
0.2 mM EDTA
0.5 % Triton X-100

25

Waschpuffer: 50 mM HEPES/KOH, pH 7,2

3. Rekombinante Expression eines identifizierten Stärke phosphorylierenden Proteins

30 a) Herstellung eines bakteriellen Expressionsvektors enthaltend eine cDNA, die ein Stärke phosphorylierendes Protein codiert

Die cDNA codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein kann z.B. unter Verwendung von mRNA oder poly-A-plus-mRNA aus pflanzlichen Geweben als „Template“ mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert werden. Dazu wird zunächst eine reverse-Transkriptase für die Herstellung eines zur einem Stärke phosphorylierenden Protein codierenden mRNA komplementären cDNA Stranges verwendet, bevor der betreffende cDNA Strang mittels DNA-Polymerase amplifiziert wird. So genannte „Kits“ enthaltend Substanzen, Enzyme und Anleitungen zur Durchführung von PCR Reaktionen sind käuflich erwerbbar (z.B. SuperScript™ One-Step RT-PCR System, Invitrogen, Prod. Nr.: 10928-034. Die amplifizierte cDNA codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein kann anschließend in einen bakteriellen Expressionsvektor, z.B. pDEST™17 (Invitrogen) kloniert werden. pDEST™17 enthält den T7 Promotor, der zur Initiation der Transkription von der T7-RNA-Polymerase verwendet wird. Weiterhin enthält der Expressionsvektor pDEST™17 in 5'-Richtung vom T7 Promotor eine Shine Dalgarno Sequenz gefolgt von einem Start-Codon (ATG) und von einem so genannten His-tag. Dieser His-tag besteht aus **sechs** direkt hintereinander folgenden Codons, die jeweils die Aminosäure Histidin codieren und befindet sich in dem Leseramen des genannten Start Codons. Die Klonierung einer cDNA, codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein in pDEST™17 erfolgt in der Weise, dass eine translationale Fusion zwischen den Codons für das Start Codon, den His-tag und der cDNA codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein entsteht. Dadurch wird nach Transkription, initiiert am T7 Promotor und anschließender Translation ein Stärke phosphorylierendes Protein erhalten, welches an seinem N-Terminus zusätzliche Aminosäuren, beinhaltend den His-tag, enthält.

Es sind jedoch auch andere zur Expression in Mikroorganismen geeignete Vektoren zur Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins verwendbar. Expressionsvektoren und dazugehörige Expressionsstämme sind dem Fachmann bekannt und in geeigneter Kombination auch käuflich beim entsprechenden Fachhandel erwerbbar.

30

b) Herstellung von Expressionsklonen in *Escherichia coli*

Es wird zunächst ein entsprechender Transformations kompetenter *E. coli* Stamm, der eine T7-RNA-Polymerase chromosomal codiert mit dem nach Schritt a) hergestellten Expressionsplasmid transformiert und anschließend auf durch Agar verfestigtem Nährmedium über Nacht bei 30°C inkubiert. Als Expressionstamm
5 eignen sich z.B. BL21 Stämme (Invitrogen Prod. Nr.: C6010-03 die eine T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle eines mittels IPTG induzierbarem Promotor (*lacZ*) chromosomal codieren.

Aus der Transformation hervorgehende Bakterienkolonien können mit dem Fachmann bekannten Methoden daraufhin untersucht werden, ob sie das
10 gewünschte Expressionsplasmid, enthaltend eine das Stärke phosphorylierende Protein codierende cDNA, enthalten. Es werden dabei Expressionsklone erhalten.

c) Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins in *Escherichia coli*
Zunächst wird eine Vorkultur hergestellt. Dazu wird ein Expressionsklon erhalten
15 nach Schritt b) in 30 ml Terrific Broth (TB-Medium), enthaltend ein Antibiotikum zur Selektion auf Anwesenheit des Expressionsplasmides beimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert.

Anschließend wird eine Hauptkultur zur Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins hergestellt. Dazu werden jeweils 1 Liter Erlenmeyer-Kolben, enthaltend
20 jeweils 300 ml auf 30°C vorgewärmtes TB-Medium und ein Antibiotikum zur Selektion auf Anwesenheit des Expressionsplasmides mit jeweils 10 ml einer entsprechenden Vorkultur beimpft und bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) bis zu einer Optischen Dichte (gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm; OD₆₀₀) von ca. 0,8 inkubiert.

25 Wurde zur Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins ein Expressionsplasmid verwendet, bei welchem die Expression des Stärke phosphorylierenden Proteins mittels eines induzierbaren Systems initiiert wird (z.B. der Expressionsvektor pDESTTM17 in BL21 *E. coli* Stämmen, induzierbar mittels IPTG), so wird nach Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 0,8 der in Hauptkultur der
30 betreffende Induktor (z.B. IPTG) zugegeben. Nach Zugabe des Induktors wird die Hauptkultur bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von ca. 1,8 erreicht ist. Anschließend wird die Hauptkultur für 30 Minuten auf Eis gekühlt, bevor

die Zellen der Hauptkultur durch Zentrifugation (10 Minuten bei 4.000xg und 4°C) vom Kulturmedium abgetrennt werden.

4. Reinigung eines Stärke phosphorylierenden Proteins

- 5 a) Aufschluss von ein Stärke phosphorylierendes Protein exprimierenden Zellen
Die nach Zentrifugation in Schritt c), Punkt 3 Allgemeine Methoden erhaltenen Zellen werden in Lysispuffer resuspendiert. Dabei werden ca. 4 ml Lysispuffer zu etwa 1 g Zellen gegeben. Anschließend werden die resuspendierten Zellen für 30 Minuten auf Eis inkubiert, bevor sie mit Hilfe einer Ultraschallsonde (Baudelin Sonoplus UW
10 2070, Baudelin electronic, Berlin, Einstellungen: Cycle 6, 70%, 1 Minute) unter ständiger Kühlung durch Eis aufgeschlossen werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die Zellsuspension während der Ultraschallbehandlung nicht zu stark erwärmt wird. Die nach der Ultraschallbehandlung erhaltene Suspension wird Zentrifugiert (12 Minuten bei 20.000xg, 4°C) und der nach Zentrifugation erhaltene Überstand wird
15 durch einen Filter mit 45 µm Porengröße filtriert.

b) Reinigung des Stärke phosphorylierenden Proteins

- Handelt es sich bei dem in *E. coli* Zellen exprimierten Stärke phosphorylierenden Protein um ein Fusionsprotein mit einem His-tag, so kann eine Aufreinigung mit Hilfe
20 von Nickelionen erfolgen, an welches das His-tag mit hoher Affinität bindet. Dazu werden 25 ml des in Schritt d) erhaltenen Filtrates wird mit 1 ml Ni-Agarose-Slurry (Qiagen, Prod. Nr.: 30210) versetzt und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wird das Gemisch aus Ni-Agarose-Slurry und Filtrat über eine Polystyren Säule (Pierce, Prod. Nr.: 29920) gegeben. Der Säulendurchlauf wird verworfen. Die Säule
25 wird zunächst durch Aufgeben von 8 ml Lysispuffer gewaschen, wobei der Durchlauf erneut verworfen wird. Die Elution des Stärke phosphorylierenden Proteins erfolgt dann durch fraktioniertes Aufgeben von zweimal jeweils 1 ml E1-Puffer, gefolgt von einmal 1 ml E2-Puffer und anschließend von fünfmal jeweils 1 ml E3-Puffer auf die Säule. Der Durchlauf, der bei dem Aufgeben der einzelnen Fraktion der
30 entsprechenden Elutionspuffer (E1-, E2-, E3-Puffer) auf die Säule anfällt, wird in voneinander getrennten Fraktionen aufgefangen. Aliquots dieser Fraktionen werden

anschließend mittels denaturierender SDS-Acrylamidgelelektrophorese, gefolgt von einer Comassie-Blau Färbung analysiert. Die Fraktionen, welche das Stärke phosphorylierende Protein in ausreichender Menge und zufriedenstellender Reinheit enthalten, werden vereinigt und mit Hilfe von Druckfiltration bei 4°C aufkonzentriert.

- 5 Die Druckfiltration kann z.B. mit Hilfe einer Amicon-Zelle (Amicon Ultrafiltration Cell, Model 8010, Prod. Nr.: 5121) bei Verwendung einer Diaflo PM30-Membran (Millipore, Prod. Nr.: 13212) bei 4°C erfolgen. Zur Konzentrierung können aber auch andere dem Fachmann bekannte Methoden verwendet werden.

10 c) Zusammensetzung verwendeter Puffer

Lysispuffer: 50 mM HEPES

300 mM NaCl

10 mM Imidazol

pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

- 15 1 mg/ml Lysozym (direkt vor Verwendung des Puffers zugeben)

¼ Tablette pro 10 ml Proteaseinhibitoren Complete EDTA free, (Roche Produkt Nr.: 1873580) (direkt vor Verwendung des Puffers zugeben)

Elutionspuffer E1: 50 mM HEPES

- 20 300 mM NaCl

50 mM Imidazol

pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

Elutionspuffer E2: 50 mM HEPES

- 25 300 mM NaCl

75 mM Imidazol

pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

Elutionspuffer E3: 50 mM HEPES

- 30 300 mM NaCl

250 mM Imidazol

pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

5. Rekombinante Expression eines R1 Proteins

Die Rekombinante Expression eines R1 Proteins ist in der Literatur beschrieben (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171; Mikkelsen et al., 2004, Biochemical Journal 377, 525-532), kann jedoch auch entsprechend der weiter oben unter Punkt 3. Allgemeine Methoden beschriebenen Methode betreffend die Rekombinante Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins durchgeführt werden.

6. Reinigung eines R1 Proteins

Die Aufreinigung eines R1 Proteins ist in der Literatur beschrieben (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171; Mikkelsen et al., 2004, Biochemical Journal 377, 525-532), kann jedoch auch entsprechend der weiter oben unter Punkt 4. Allgemeine Methoden beschriebenen Methode betreffend die Reinigung eines Stärke phosphorylierenden Proteins durchgeführt werden, wenn durch Expression von R1 in *E. coli* Zellen ein R1 Fusionsprotein entsteht, welches einen His-tag enthält.

7. In vitro Herstellung von phosphorylierter-Stärke ausgehend von nicht-phosphorylierter-Stärke

a) In vitro Phosphorylierung von nicht-phosphorylierter-Stärke

Stärke, welche kein Stärkephosphat enthält (z.B. isoliert aus Blättern von *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutanten mit Hilfe der oben unter Punkt 2, Allgemeine Methoden beschriebenen Methode) wird mit R1 Puffer und mit gereinigtem R1 Protein (ca. 0,25 µg R1 Protein pro mg Stärke) versetzt, so dass sich ein Stärkegehalt von 25 mg pro ml ergibt. Dieser Reaktionsansatz wird über Nacht (ca. 15 h) bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. An die im Reaktionsansatz vorliegende Stärke gebundenes R1 wird nach Abschluss der Reaktion durch vier maliges Waschen mit jeweils ca. 800 µl 0,5 % SDS entfernt. Anschließend wird das noch in der *in vitro* phosphorylierten Stärke vorliegende SDS durch fünf maliges Waschen mit jeweils 1 ml Waschpuffer von entfernt. Alle Waschschritte finden jeweils bei Raumtemperatur für 10 bis 15 Minuten unter Schütteln statt. Nach jedem Waschschritt erfolgt eine

Zentrifugation (2 min, 10.000xg), um die Stärkegranula vom betreffenden SDS-Puffer oder Waschpuffer abzutrennen.

b) Zusammensetzung verwendeter Puffer

- | | | | | | |
|---|------------|--------|-------------------|----|-----|
| 5 | R1-Puffer: | 50 mM | HEPES/KOH, | pH | 7,5 |
| | | 1 mM | EDTA | | |
| | | 6 mM | MgCl ₂ | | |
| | | 0,5 mM | ATP | | |
- 10 Waschpuffer: 50 mM HEPES/KOH, pH 7,2

8. Bindung von Proteinen an phosphorylierte-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke

- a) Isolierung von P-Stärke-Protein-Komplexen bzw. nicht-phosphorylierter-
- 15 Stärke-Protein-Komplexen
- Ca. 50 mg P-Stärke, bzw. ca. 50 mg nicht-phosphorylierte Stärke werden in getrennten Ansätzen jeweils in ca. 800 µl Proteinextrakt resuspendiert. Die Proteinkonzentration der Proteinextrakte sollte jeweils ca. 4 mg bis 5 mg pro ml betragen. Die Inkubation der P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierten-Stärke mit
- 20 Proteinextrakten wird bei Raumtemperatur für 15 Minuten unter Schütteln bei 4°C durchgeführt. Nach erfolgter Inkubation werden die Reaktionsansätze über ein Percoll-Kissen (4 ml) abzentrifugiert (15 Minuten, 3500 rpm, 4°C). Nicht an phosphorylierte Stärke bzw. P-Stärke gebundene Proteine befinden sich nach Zentrifugation im Überstand und können mit einer Pasteurpipette abgenommen
- 25 werde. Der Überstand wird verworfen. Das nach Zentrifugation erhaltene sedimentierte Pellet enthaltend P-Stärke und nicht-phosphorylierte-Stärke inclusive der an die betreffenden Stärken jeweils gebundene Proteine (P-Stärke-Protein-Komplexe bzw. nicht-phosphorylierter-Stärke-Protein-Komplexe), wird zweimal mit je 1 ml Waschpuffer (siehe oben, Allgemeine Methoden unter Punkt 7.b)), durch
- 30 Inkubation für jeweils 3 Minuten bei 4°C unter Schütteln gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgt eine Zentrifugation (5 Minuten, 8000 rpm, 4°C in einer

Tischzentrifuge, Hettich EBA 12R), um die P-Stärke, bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke von dem Waschpuffer abzutrennen.

- b) In Lösung bringen der in den P-Stärke-Protein-Komplexen bzw. nicht-phosphorylierter-Stärke-Protein-Komplexen gebundenen Proteinen

Die nach Schritt a) erhaltenen P-Stärke-Protein-Komplexe bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke-Protein-Komplexe werden jeweils in ca. 150 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert und 15 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke von den in Lösung gebrachten Proteinen durch Zentrifugation (1 Minute, 13.000 rpm, Raumtemperatur, Eppendorf Tischzentrifuge) abgetrennt. Der nach Zentrifugation erhaltene Überstand wird zur Entfernung jeglicher Reste von P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke noch einmal zentrifugiert (1 Minute, 13.000 rpm, Raumtemperatur, Eppendorf Tischzentrifuge) und abgenommen. Es werden dadurch in Lösung gebrachte Proteine, die an P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke binden, erhalten.

- c) Zusammensetzung verwendeter Puffer

SDS-Probenpuffer: 187,5 mM Tris/HCl pH 6,8

20	6 %	SDS
	30 %	Glycerin
	~ 0,015 %	Bromphenolblau
	60 mM	DTE (frisch zusetzen!)

- 25 Percoll: Percoll wird über Nacht gegen eine Lösung, bestehend aus und 25 mM HEPES / KOH, pH 7,0 dialysiert

9. Auftrennung von Proteinen, die an P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke binden

- 30 Die nach Schritt c) unter Punkt 8. Allgemeine Methoden betreffend die Bindung von Proteinen an P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke erhaltenen in Lösung

gebrachten Proteine werden jeweils für 5 Minuten bei 95°C inkubiert und anschließend mit Hilfe denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Dabei wird für die durch Bindung an P-Stärke und für die durch Bindung an nicht-phosphorylierte-Stärke erhaltenen in Lösung gebrachten Proteine jeweils ein
5 gleiches Volumen auf das Acrylamidgel aufgetragen. Das nach erfolgter Elektrophorese erhaltene Gel wird mindestens über Nacht mit kolloidalem Comassie (Roth, Karlsruhe, Roti-Blue Rod. Nr.: A152.1) gefärbt und anschließend in 30 % Methanol, 5 % Essigsäure, oder in 25% Methanol entfärbt.

10 10. Identifizierung und Isolierung von an P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke bindenden Proteinen

a) Identifizierung von Proteinen mit erhöhter Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke

Proteine, die, nach Auftrennung mittels Acrylamidgelelektrophorese und
15 anschließender Sichtbarmachung durch Färbung (siehe oben, Punkt 9. Allgemeine Methoden), ein verstärktes Signal nach Bindung an P-Stärke im Vergleich zu einem entsprechenden Signal nach Bindung an nicht-phosphorylierte-Stärke zeigen, weisen eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke auf. Dadurch können Proteine, die eine erhöhte
20 Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweisen, identifiziert werden. Proteine, die eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweisen, werden aus dem Acrylamidgel ausgeschnitten.

25 Identifizierung der Aminosäuresequenz von Proteinen, die eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweisen

Nach Schritt a) identifizierte Proteine werden mit Trypsin verdaut und die erhaltenen Peptide zur Ermittlung der Massen der erhaltenen Peptide mittels MALDI-TOF
30 analysiert. Trypsin ist eine sequenzspezifische Protease, d.h. Trypsin spaltet Proteine an einer vorgegebenen Stelle nur dann, wenn die betreffenden Proteine

bestimmte Aminosäuresequenzen enthalten. Trypsin spaltet Peptidbindungen immer dann, wenn vom N-Terminus ausgehend die Aminosäuren Arginin und Lysin aufeinander folgen. Dadurch ist es möglich, sämtliche Peptide, die nach Trypsin Verdau einer Aminosäuresequenz entstehen würden, theoretisch zu ermitteln. Durch
5 die Kenntnis der die theoretisch ermittelten Peptide codierenden Aminosäuren können auch die Massen der Peptide, die nach theoretischem Trypsin Verdau erhalten werden, ermittelt werden. Datenbanken (z.B. NCBI <http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>; Swissprot <http://cbrg.inf.ethz.ch/Server/MassSearch.html>) die Informationen über die Massen
10 von Peptiden nach theoretischem Trypsin Verdau enthalten, können daher mit den real mittels MALDI-TOF-MS erhaltenen Massen von Peptiden unbekannter Proteine verglichen werden. Aminosäuresequenzen, die gleiche Peptidmassen nach theoretischem und/oder realem Trypsin Verdau aufweisen, sind als identisch anzusehen. Die betreffenden Datenbanken enthalten sowohl Peptidmassen von
15 Proteinen, deren Funktion bereits nachgewiesen wurde, als auch Peptidmassen von Proteinen, welche bisher nur hypothetisch durch Ableitung von Aminosäuresequenzen ausgehend von in Sequenzierprojekten erhaltenen Nucleinsäuresequenzen existieren. Die tatsächliche Existenz und die Funktion solcher hypothetischen Proteine ist daher selten nachgewiesen und wenn überhaupt
20 eine Funktion angegeben ist, dann beruht diese meist alleinig auf Vorhersagen, jedoch nicht auf einem tatsächlichen Nachweis der Funktion.

Banden, enthaltend nach Schritt a) identifizierte Proteine werden aus dem Acrylamidgel ausgeschnitten; das ausgeschnittene Acrylamidstück wird zerkleinert und durch Inkubation für ca. eine halbe Stunde bei 37°C in ca. 1 ml 60% 50mM
25 NH_4HCO_3 , 40% Acetonitril entfärbt. Anschließend wird die Entfärbelösung abgenommen und das verbleibende Gel unter Vakuum (z.B. Speedvac) getrocknet. Nach Trocknung wird Trypsinlösung zum Verdau des in dem betreffenden Gelstück enthaltenen Proteins hinzu gegeben. Der Verdau erfolgt über Nacht bei 37°C. Nach dem Verdau wird wenig (bis das Acrylamidgel sich weißlich färbt) Acetonitril
30 zugegeben und der Ansatz unter Vakuum (z.B. Speedvac) getrocknet. Nach erfolgter Trocknung wird so viel 5%ige Ameisensäure zugegeben, dass die getrockneten Bestandteile gerade bedeckt sind und für einige Minuten bei 37°C inkubiert. Die

Behandlung mit Acetonitril gefolgt von der Trocknung wird einmal wiederholt. Anschließend werden die getrockneten Bestandteile in 0,1% TFA (Trifluoressigsäure, 5 µl bis 10 µl) aufgenommen und in ca. 0,5 µl Portionen auf einen Träger aufgetropft. Auf den Träger werden ebenfalls gleiche Mengen Matrix (ϵ -Cyano-4-
5 hydroxymizinsäure) aufgegeben. Nach Auskristallisieren der Matrix werden die Massen der Peptide mittels MALDI-TOF-MS-MS (z.B. Burker ReflexTM II, Bruker Daltonics, Bremen) ermittelt. Mit den erhaltenen Massen werden Datenbanken auf Aminosäuresequenzen hin durchsucht, welche nach theoretischem Trypsinverdau gleiche Massen ergeben. Somit können Aminosäuresequenzen identifiziert werden,
10 welche Proteine codieren, die bevorzugt an phosphorylierte alpha-1,4-Glucose binden und/oder P-alpha-1,4-Glucose als Substrat benötigen.

11. Verfahren zum Nachweis von Stärke phosphorylierender Aktivität eines Proteins

- 15 a) Inkubation von Proteinen mit P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierter-Stärke
Um nachzuweisen, ob ein Protein eine Stärke phosphorylierende Aktivität aufweist, können zu untersuchende Proteine mit Stärke und radioaktiv markiertem ATP inkubiert werden. Dazu werden ca. 5 mg P-Stärke bzw. ca. 5 mg nicht-phosphorylierte-Stärke mit dem zu untersuchenden Protein (**0,01 µg bis 5,0 µg pro**
20 **mg eingesetzter Stärke**) in 500 µl Phosphorylierungspuffer für 10 Minuten bis 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von SDS bis zu einer Konzentration von 2% (Gewicht/Volumen) gestoppt. Die im jeweiligen Reaktionsgemisch vorliegenden Stärkegranula werden abzentrifugiert (1 Minute, 13.000xg), einmal mit 900 µl einer 2
25 % SDS Lösung und jeweils viermal mit 900 µl einer 2 mM ATP Lösung gewaschen. Jeder Waschschrift wird für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln durchgeführt. Nach jedem Waschschrift werden die Stärkegranula durch Zentrifugation (1 Minute, 13.000xg) vom betreffenden Waschpuffer abgetrennt.
Zusätzlich sollten bei der Durchführung eines Experimentes zum Nachweis von
30 Stärke phosphorylierender Aktivität eines Proteins weitere Reaktionsansätze, die kein Protein oder inaktiviertes Protein enthalten, ansonsten aber in gleicher Weise

wie die beschriebenen Reaktionsansätze behandelt werden, als so genannte Kontrollen mitgeführt werden.

- b) Ermittlung der Menge an durch enzymatische Aktivität in die P-Stärke
5 und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke eingebauten Phosphatreste

Die nach Schritt a) erhaltenen Stärkegranula können auf das Vorliegen von
radioaktiv markierten Phosphatresten hin untersucht werden. Dazu wird die jeweilige
Stärke in je 100 µl Wasser resuspendiert und mit jeweils 3 ml Scintillationscocktail
(z.B. Ready Safe™, BECKMANN Coulter) versetzt und anschließend mit Hilfe eines
10 Scintillationszählers (z.B. LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN
COULTER™) analysiert.

- c) Identifizierung von Proteinen, die bevorzugt P-Stärke als Substrat verwenden
Wird ein Protein in getrennten Ansätzen einmal mit P-Stärke und einmal mit nicht-
15 phosphorylierter-Stärke nach der unter a) beschriebenen Methode inkubiert, so kann
durch Vergleich der nach Schritt b) erhaltenen Werte für das Vorliegen von
Stärkephosphat ermittelt werden, ob das betreffende Protein mehr Phosphat in P-
Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke eingebaut hat. Damit können
auch Proteine identifiziert werden, die Phosphat in P-Stärke, nicht jedoch in nicht-
20 phosphorylierte-Stärke einführen können. D.h. es können Proteine identifiziert
werden, die bereits phosphorylierte Stärke als Substrat für eine weitere
Phosphorylierungsreaktion benötigen.

- d) Zusammensetzung verwendeter Puffer

25 Phosphorylierungs-Puffer:

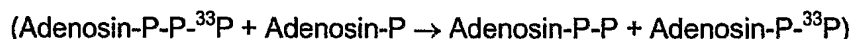
- | | |
|-----------------|-------------------|
| 50 mM | HEPES/KOH, pH 7,5 |
| 1 mM | EDTA |
| 6 mM | MgCl ₂ |
| 0,01 bis 0,5 mM | ATP |
- 30 0,2 bis 2 µCi pro ml randomisiertes ³³P-ATP (alternativ kann auch ATP
eingesetzt werden, welches einen spezifisch in beta-Position markierten
Phosphatrest enthält)

Unter dem Begriff „randomisiertes ATP“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ATP verstanden werden, welches sowohl in gamma-Position, als auch in beta-Position markierte Phosphatreste enthält (Ritte et al. 2002, PNAS 99, 7166-7171). Randomisiertes ATP wird in der wissenschaftlichen Literatur auch als Beta/gamma-ATP bezeichnet. Eine Methode zur Herstellung von randomisiertem ATP ist im Folgenden beschrieben.

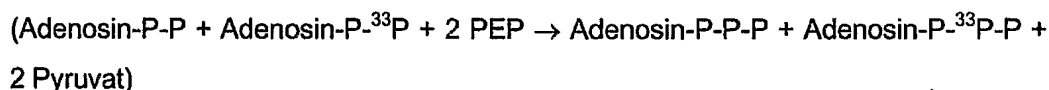
i) Herstellung von randomisiertem ATP

Der hier beschriebenen Methode zur Herstellung von randomisiertem ATP mit Hilfe von Enzym katalysierten Reaktionen liegen folgende Reaktionsmechanismen zu Grunde:

1. Reaktionsschritt:



2. Reaktionsschritt:



Die Reaktionsgleichgewichte liegen auf Produktseite, trotzdem entsteht bei dieser Reaktion eine Mischung aus größtenteils $\beta^{33}\text{P-ATP}$ und etwas $\gamma^{33}\text{P-ATP}$.

ii) Durchführung des 1. Reaktionsschrittes

ATP (100 μCi , 3000 Ci pro mmol), welches einen in gamma-Position mit ^{33}P markierten Phosphatrest enthält (Hartmann Analytic, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$), wird mit 2 μl Myokinase (AMP-phosphotransferase, aus Kaninchen Muskel; SIGMA, Prod. Nr.: M3003 3,8 mg/ml, 1,626 Units/mg) in 90 μl Randomisierungspuffer für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Inkubation für 12 Minuten bei 95°C gestoppt, bevor der Reaktionsansatz mittels Zentrifugalfiltration über einen Microcon YM 10 Filter (Amicon, Millipore Prod. Nr. 42407) bei 14.000xg für mindestens 10 Minuten aufgereinigt wird.

iii) Durchführung des 2. Reaktionsschrittes

Dem in Schritt ii) erhaltenen Filtrat werden 2 µl Pyruvatkinase (zur Herstellung einer entsprechenden Lösung siehe unten) und 3 µl 50 mM PEP (Phosphoenolpyruvat) zugegeben. Dieses Reaktionsgemisch wird für 45 Minuten bei 30°C inkubiert, bevor die Reaktion durch Inkubation bei 95°C für 12 Minuten gestoppt wird. Anschließend wird das Reaktionsgemisch zentrifugiert (2 Minuten, 12.000 rpm in einer Eppendorftischzentrifuge). Der nach Zentrifugation erhaltene, randomisierte ATP enthaltende Überstand wird abgenommen, aliquotiert und kann bei -20°C gelagert werden.

10 Herstellung der Pyruvatkinase Lösung

15 µl Pyruvatkinase (aus Kaninchenmuskel, Roche, Prod. Nr. 12815), 10 mg/ml, 200 Units/mg bei 25 °C) werden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 27 µl Pyruvatkinasepuffer aufgenommen.

iv) Verwendete Puffer

15 Pyruvatkinasepuffer: 50 mM HEPES/KOH pH 7,5
1 mM EDTA

Randomisierungspuffer: 100 mM HEPES/KOH pH 7,5
1 mM EDTA
20 10 % Glycerol
5 mM MgCl₂
5 mM KCl
0,1 mM ATP
0,3 mM AMP

25

12. Nachweis der Autophosphorylierung eines Proteins

Um nachzuweisen, ob ein Protein eine autophosphorylierende Aktivität aufweist, können zu untersuchende Proteine mit radioaktiv markiertem ATP inkubiert werden. Dazu werden zu untersuchende Proteine (50 µg bis 100 µg) in 220 µl Phosphorylierungspuffer (siehe oben, Punkt 12 d), Allgemeine Methoden) für 30 Minuten bis 90 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend

wird die Reaktion durch Zugabe von EDTA bis zu einer Endkonzentration von 0,11 M gestoppt. Ca. 2 µg bis 4 µg Protein werden mit Hilfe denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese (7,5%iges Acrylamidgel) aufgetrennt. Das nach Polyacrylamidgelelektrophorese erhaltene Gel wird einer Autoradiographie unterzogen. Proteine, die in der Autoradiographie ein Signal zeigen, tragen einen radioaktiven Phosphatrest.

13. Identifizierung der C-Atom-Positionen der Glucosemoleküle eines alpha-1,4-Glucans, in welche Phosphatreste durch ein Stärke phosphorylierendes Protein eingeführt werden

Welche C-Atom-Positionen der Glucosemoleküle eines alpha-1,4-Glucans von einem Protein phosphoryliert werden, kann durch Hydrolyse der durch ein betreffendes Protein *in vitro* phosphorylierten erhaltenen Glucane, anschließender Auftrennung der nach Hydrolyse erhaltenen Glucosemonomere, gefolgt von Messung des durch ein betreffendes Protein eingebautes Phosphat in bestimmte Fraktionen der Glucosemoleküle geführt nachgewiesen werden.

a) Totalhydrolyse der alpha-1,4-Glucane

Alpha-1,4-Glucan enthaltende Wasser-Suspensionen werden zentrifugiert, das sedimentierte Pellet anschließend in 0,7 M HCl (Baker, zur Analyse) resuspendiert und unter Schütteln für 2 Stunden bei 95°C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation werden die Proben kurz abgekühlt und zentrifugiert (z.B. 2 Minuten 10.000xg). Der erhaltene Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 2 M NaOH (Baker, zur Analyse) neutralisiert. Falls ein Pellet zurück bleibt, wird es in 100 µl Wasser resuspendiert und die Menge des darin vorliegenden markierten Phosphates zur Kontrolle bestimmt.

Der neutralisierte Überstand wird anschließend über einen 10 kDa Filter zentrifugiert. Durch Messung eines Aliquots des erhaltenen Filtrates wird die Menge an markiertem Phosphat im Filtrat z.B. mit Hilfe eines Scintillationszählers bestimmt.

b) Fraktionierung der Hydrolyseprodukte und Ermittlung der phosphorylierten C-Atom Positionen

Die mittels Schritt a) erhaltenen neutralisierten Filtrate der Hydrolyseprodukte können (bei Verwendung von radioaktiv markiertem ATP etwa 3.000 cpm) mit Hilfe von z.B.

- 5 Hoch-Druck-Anionenaustausch-Chromatographie (HPAE) aufgetrennt werden. Zur Einstellung des für die HPAE benötigten Volumens kann das neutralisierte Filtrat mit H₂O verdünnt werden. Weiterhin wird den entsprechenden Filtraten als interne Kontrolle jeweils Glucose-6-Phosphat (ca. 0,15 mM) und Glucose-3-Phosphat (ca. 0,3 mM) zugegeben. Die Auftrennung mittels HPAE kann z.B. mit Hilfe einer Dionex
- 10 Anlage DX 600 Bio Lc unter Verwendung einer CarboPac PA 100 Säule (mit entsprechender Vorsäule) und eines gepulsten amperometrischen Detektors (ED 50) Detektors erfolgen. Dabei wird vor Injektion der Probe die Säule zunächst für 10 Minuten mit 99% Eluent C und 1% Eluent D gespült. Anschließend werden jeweils 60 µl Probenvolumen injiziert. Die Elution der Probe erfolgt durch folgende
- 15 Bedingungen:

Flußrate: 1 ml pro Minute

Gradient: linear ansteigend von 0 Minuten bis 30 Minuten

		Eluent C	Eluent D
	0 Minuten	99%	1%
20	30 Minuten	0%	100%
	35 Minuten	0%	100%
	Stop des Laufes		

- Die von der Säule eluierten Hydrolyseprodukte werden in einzelnen Fraktionen von
- 25 je 1 ml aufgefangen. Da den injizierten Proben der Hydrolyseprodukte jeweils nicht markiertes Glucose-3-Phosphat (Ritte et al. 2002, PNAS 99, 7166-7171) und nicht markiertes Glucose-6-Phosphat (Sigma, Prod. Nr.: G7879) als interne Standards zugemischt wurden, können mittels gepulster amperometrischer Detektion die Fraktionen ermittelt werden, welche entweder Glucose-3-Phosphat oder Glucose-6-
- 30 Phosphat enthalten. Durch Messung der Menge an markierten Phosphaten in den einzelnen Fraktionen und anschließendem Vergleich mit den Fraktionen, welche Glucose-3-Phosphat oder Glucose-6-Phosphat enthalten, können damit diejenigen

Fraktionen ermittelt werden, in welchen markiertes Glucose-6-Phosphat oder markiertes Glucose-3-Phosphat enthalten ist. Die Menge des markierten Phosphates in den betreffenden Fraktion wird bestimmt. Durch die Verhältnisse der für markiertes Phosphat gemessenen Mengen an Glucose-3-Phosphat zu Glucose-6-Phosphat in
5 den einzelnen Hydrolyseprodukten, kann nun ermittelt werden, welche C-Atom-Position von einem alpha-1,4-Glucan phosphorylierenden Enzym bevorzugt phosphoryliert wird.

c) Verwendete Puffer

- 10 Eluent C: 100 mM NaOH
Eluent D: 100 mM NaOH
500 mM Natriumacetat

14. Transformation von Reispflanzen

- 15 Reispflanzen wurden nach der von Hiei et al. (1994, Plant Journal 6(2), 271-282) beschriebenen Methode transformiert.

15. Transformation von Weizenpflanzen

- Weizenpflanzen wurden nach der bei Becker et al. (1994, Plant Journal 5, 299-307)
20 beschriebenen Methode transformiert.

16. Transformation von Maispflanzen

- Unreife Embryonen von Maispflanzen der Linie A188 wurden nach der bei Ishida et al. (1996, Nature Biotechnology 14, 745-750) beschriebenen Methode transformiert.
25

17. Bestimmung des Gehaltes an Stärkephosphat

a) Bestimmung des C-6-Phosphatgehaltes

In der Stärke können die Positionen C2, C3 und C6 der Glukoseeinheiten phosphoryliert sein. Zur Bestimmung des C6-P-Gehaltes der Stärke werden 50 mg

Stärke in 500 µl 0,7 M HCl 4 h bei 95°C hydrolysiert. Anschließend werden die Ansätze für 10 min bei 15500 g zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Von den Überständen werden 7µl mit 193 µl Imidazol-Puffer (100 mM Imidazol, pH 7,4; 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA und 0,4 mM NAD) gemischt. Die Messung wurde im
5 Photometer bei 340 nm durchgeführt. Nach der Etablierung einer Basisabsorption wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe von 2 Einheiten (units) Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (von Leuconostoc mesenteroides, Boehringer Mannheim) gestartet. Die Absorptionsänderung ist direkt proportional zur Konzentration des G-6-P Gehaltes der Stärke.

10

b) Bestimmung des Gesamtposphatgehaltes

Die Bestimmung des Gesamtposphatgehaltes erfolgte nach der Methode von Ames (Methods in Enzymology VIII, (1966), 115-118).

Es werden ca. 50 mg Stärke mit 30 µl ethanolischer Magnesiumnitrat-Lösung
15 versetzt und drei Stunden bei 500°C im Muffelofen verascht. Der Rückstand wird mit 300 µl 0,5 M Salzsäure versetzt und 30 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wird ein Aliquot auf 300 µl 0,5 M Salzsäure aufgefüllt, zu einer Mischung aus 100 µl 10%iger Ascorbinsäure und 600 µl 0,42% Ammoniummolybdat in 2 M Schwefelsäure gegeben und 20 min bei 45°C inkubiert.

20

c) Bestimmung des Gehaltes an C-6-Phosphat und C-3-Phosphat

Zur Bestimmung des Gehaltes an Phosphat, welcher in C-6-Position und in C-3-Position der Glucosemoleküle eines alpha-1,4-Glucans gebunden ist, können die betreffenden Glucane nach Totalhydrolyse nach der unter Allgemeine Methoden 13
25 angeführten Methode mittels HPAE aufgetrennt werden. Die Mengen an Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat können durch Integration der einzelnen, nach HPEA Auftrennung erhaltenen Peakflächen ermittelt werden. Durch Vergleich der erhaltenen Peakflächen für Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat in unbekannten Proben, mit den Peakflächen, die nach Auftrennung mittels HPEA mit
30 bekannten Mengen an Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat erhalten werden, kann die Menge von Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat in den zu untersuchenden Proben bestimmt werden.

Beispiele

- 5 1. Isolierung eines Proteins aus *Arabidopsis thaliana*, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweist
- a) Herstellung von Proteinextrakten aus *Arabidopsis thaliana*
Proteinextrakte wurden aus etwa 7 g Blättern (**Frischgewicht**) von *Arabidopsis*
10 *thaliana* (Ökotyp Columbia, Col-O) nach dem unter Punkt 1, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren hergestellt.
- b) Isolierung von Stärkegranula aus Blättern von *sex1-3* Mutanten von *Arabidopsis thaliana*
15 Stärkegranula wurden aus etwa 20 g (Frischgewicht) aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* nach dem unter Punkt 2., Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren isoliert.
- c) *In vitro* Phosphorylierung von Stärke, isoliert aus einer *sex1-3* Mutante von
20 *Arabidopsis thaliana* mit gereinigtem R1 Protein
Etwa 30 mg nicht-phosphorylierte-Stärke, isoliert aus einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* wurde nach dem unter Punkt 7., Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren mittels eines rekombinant in *E. coli* exprimierten und gereinigten R1 Proteins phosphoryliert. Zur Expression des R1 Proteins in *E. coli* und
25 zur anschließenden Aufreinigung wurden die bei Ritte et al. (2002, PNAS 99, 7166-7171) beschriebenen Verfahren verwendet.
- d) Isolierung von Proteinen, die an P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke binden
30 Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Schritt a) wurden in einem Ansatz A mit 50 mg der nach Schritt c) hergestellten *in vitro* phosphorylierten Stärke

nach dem unter Punkt 8 a), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren inkubiert und gewaschen.

In einem zweiten Ansatz B wurden Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Schritt a) mit 50 mg der nach Schritt b) hergestellten nicht-phosphorylierten-

- 5 Stärke nach dem unter Punkt 8 a), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren inkubiert und gewaschen.

Anschließend wurden die an P-Stärke des Ansatzes A und die an nicht-phosphorylierte-Stärke des Ansatzes B nach dem unter Punkt 8 b), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren in Lösung gebracht.

- 10 In einem dritten Ansatz C wurden 50 mg der nach Schritt c) hergestellten *in vitro* phosphorylierten Stärke nach dem unter Punkt 8 a), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren inkubiert und gewaschen. Ansatz C enthielt jedoch keinen Proteinextrakt.

- 15 e) Auftrennung der nach Schritt d) erhaltenen Proteine mittels Acrylamidgelelektrophorese

Die in Schritt d) erhaltenen Proteine der Ansätze A, B und C wurden mittels einem 9%igem Acrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen (SDS) nach dem unter Punkt 9., Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren aufgetrennt und
20 anschließend mit Comassie Blau gefärbt. Das gefärbte Gel ist in Fig. 1 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass ein Protein, welches im denaturierenden Acrylamidgel bezogen auf eine Proteinstandardmarker (Spur M) ein Molekulargewicht von ca. 130 kDa aufweist, bevorzugt an phosphorylierte Stärke Spur P) im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke (K) bindet.

25

- f) Identifizierung des Proteins, das bevorzugt an P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke bindet

Die in Schritt e) identifizierte Bande des Proteins mit einem Molekulargewicht von ca. 130 kDa wurde aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde das Protein wie
30 unter Allgemeine Methoden 10 b) beschrieben, aus dem Acrylamid herausgelöst, mit Trypsin verdaut und die erhaltenen Peptidmassen mittels MALD-TOF-MS bestimmt. Der durch MALDI-TOF-MS erhaltene so genannte „Fingerprint“ wurde mit in

Datenbanken (Mascot: http://www.matrixscience.com/search_form_select.html;
ProFound: http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe; PepSea:
<http://195.41.108.38/PepSeaIntro.html>) enthaltenen Fingerprints theoretisch
verdauter Aminosäuremoleküle verglichen. Da ein solcher Fingerprint sehr spezifisch
5 für ein Protein ist, konnte ein Aminosäuremolekül identifiziert werden. Mit Hilfe der
Sequenz dieses Aminosäuremoleküls konnte eine ein OK1 Protein codierende
Nucleinsäuresequenz aus *Arabidopsis thaliana* isoliert werden. Das mit diesem
Verfahren identifizierte Protein wurde mit A.t.-OK1 bezeichnet. Nach Analyse der
Aminosäuresequenz des OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana*, ergab sich, dass
10 diese von der in der Datenbank vorliegenden Sequenz (NP 198009, NCBI) abweicht.
Die in SEQ ID No 2 dargestellte Aminosäuresequenz codiert das A.t.-OK1 Protein.
SEQ ID No 2 enthält im Vergleich mit der Sequenz der Datenbank (Acc.: NP
198009.1, NCBI) Abweichungen. Die in SEQ ID No 2 enthaltenen Aminosäuren 519
bis 523 (WRLCE) und 762 bis 766 (VRARQ) sind nicht in der Sequenz, welche in der
15 Datenbank vorliegt (ACC.: NP 198009.1) enthalten. Gegenüber der Version 2 der
Datenbanksequenz (Acc.: NP 198009.2) enthält die in SEQ ID NO 2 dargestellte
Aminosäuresequenz noch die zusätzlichen Aminosäuren 519 bis 523 (WRLCE).

2. Klonierung einer cDNA, die das identifizierte OK1 Protein codiert

Die A.t.-OK1 cDNA wurde mit Hilfe reverser PCR unter Verwendung von mRNA,
20 isoliert aus Blättern von *Arabidopsis thaliana* isoliert. Dazu wurde ein cDNA Strang
mittels reverser Transkriptase SuperScriptTM First-Strand Synthesis System for RT
PCR, Invitrogen Prod. Nr.: 11904-018) synthetisiert, welcher dann unter Verwendung
von DNA Polymerase amplifiziert (Expand High Fidelity PCR Systems, Roche Prod.
Nr.: 1732641) wurde. Das erhaltene Amplifikat dieser PCR Reaktion wurde in den
25 Vektor pGEM[®]-T (Invitrogen Prod. Nr.: A3600) kloniert. Das erhaltene Plasmid wird
mit A.t.-OK1-pGEM bezeichnet, die das A.t.-OK1 Protein codierende cDNA Sequenz
wurde ermittelt und ist unter SEQ ID NO. 1 dargestellt.

Die unter SEQ ID NO 1 dargestellte Sequenz entspricht nicht der Sequenz, die in der
Datenbank enthalten ist. Diese wurde oben bereits für die Aminosäuresequenz,
30 codierend ein A.t.-OK1 Protein diskutiert.

Verwendete Bedingungen für die Amplifikation der cDNA codierend das A.t.-OK1 Proteins

Erststrangsynthese:

Es wurden die vom Hersteller angegebenen Bedingungen und Puffer verwendet. Der

- 5 Reaktionsansatz für die Erststrangsynthese enthielt außerdem folgende Substanzen:

3 µg Gesamt-RNA

5 µM 3'-Primer (OK1rev1: 5'-GACTCAACCACATAACACACAAAGATC)

0,83 µM dNTP Mix

Der Reaktionsansatz wurde für 5 Minuten bei 75°C inkubiert und anschließend auf

- 10 Raumtemperatur abgekühlt.

Anschließend wurden 1st Strand buffer, RNase Inhibitor und DTT zugegeben und für 2 Minuten bei 42°C inkubiert, bevor 1 µL Superscript RT DNA Polymerase zugegeben wurde und der Reaktionsansatz für 50 Minuten bei 42°C inkubiert wurde.

Bedingungen Für die Amplifikation des Erststranges mittels PCR:

- 15 1 µL des Reaktionsansatzes der Erststrangsynthese

0.25 µM 3'Primer (OK1rev2: 5'- TGGTAACGAGGCAAATGCAGA)

0.25 µM 5'Primer (OK1fwd2: 5'- ATCTCTTATCACACCACCTCCAATG)

Reaktionsbedingungen:

Schritt 1 95°C 2 min

- 20 Schritt 2 94°C 20 sec

Schritt 3 62°C 30 sec (Temp. pro Zyklus -0.67°C) (30 s), 68°C (

Schritt 4 68°C 4 Minuten

Schritt 5 94°C 20 sec

Schritt 6 56°C 30 sec

- 25 Schritt 7 68°C 4 Minuten

Schritt 8 68°C 10 Minuten

Zunächst wurde die Reaktion nach den Schritten 1 bis 4 durchgeführt. Zwischen Schritt 4 und Schritt 2 folgten 10 Wiederholungen (Zyklen), wobei die Temperatur des Schrittes 3 nach jedem Zyklus um 0,67°C verringert wurde. Anschließend
30 erfolgte die Reaktion nach den in Schritten 5 bis 8 angegebenen Bedingungen. Zwischen Schritt 7 und Schritt 5 folgten 25 Wiederholungen (Zyklen), wobei die Zeit

des Schrittes 7 je Zyklus um 5 sec verlängert wurde. Nach erfolgter Reaktion wurde die Reaktion auf 4°C gekühlt.

3. Herstellung eines Vektors, zur rekombinanten Expression der cDNA des OK1 Proteins

- 5 Die Sequenz codierend das OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* wurde nach Amplifikation mittels PCR durch Verwendung des Plasmides A.t.-OK1-pGEM als Template unter Verwendung der Gateway Technologie (Invitrogen) zunächst in den Vektor pDONOR™ 201 (Invitrogen Prod. Nr.: 11798-014) kloniert. Anschließend wurde die codierende Region des OK1 Proteins aus dem erhaltenen Vektor durch
- 10 sequenzspezifische Rekombination in den Expressionsvektor pDEST17™ (Invitrogen Prod. Nr.: 11803-014) kloniert. Der erhaltene Expressionsvektor wird mit A.t.-OK1-pDEST™17 bezeichnet. Durch die Klonierung entstand eine translationale Fusion der das A.t.-OK1 Protein codierenden cDNA mit in dem Expressionssvektor pDEST™17 vorliegenden Nucleotiden. Die aus dem Vektor pDEST™17 stammenden Nucleotide,
- 15 die mit der cDNA codierend das A.t.-OK1 Protein translational fusioniert sind, codieren 21 Aminosäuren. Diese 21 Aminosäuren umfassen u.a. das Start Codon (ATG) und einen so genannten His-tag (6 Histidinreste direkt hintereinander). Nach Translation dieser translational fusionierten Sequenzen entsteht dadurch ein A.t.-OK1 Protein, welches an seinem N-terminus die zusätzlichen 21 Aminosäuren,
- 20 codiert durch Nucleotide, stammend aus dem Vektor aufweist. Das aus diesem Vektor resultierende rekombinante A.t.-OK1-Protein enthält daher 21, aus dem Vektor pDEST™17 stammende, zusätzliche Aminosäuren an seinem N-Terminus.

4. Heterologe Expression des OK1 Proteins in E. coli

- 25 Der nach Beispiel 3 erhaltene Expressionsvektorektor A.t.-OK1-pDEST™17 wurde in den *E. coli* Stamm BL21 Star™ (DE3) (Invitrogen, Prod. Nr. C6010-03) transformiert. Eine Beschreibung diese Expressionssystems ist bereits weiter oben (siehe Punkt 3., Allgemeine Methoden) erfolgt. Aus der Transformation resultierende Bakterienklone, enthaltend den Vektor A.t.-OK1-pDEST™17, dienten zunächst zur Herstellung einer
- 30 Vorkultur, die anschließend zur Beimpfung einer Hauptkultur verwendet wurde (siehe

Punkt 3.c), Allgemeine Methoden). Vorkultur und Hauptkultur wurden jeweils bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert. Nachdem die Hauptkultur eine OD₆₀₀ von ca. 0,8 erreicht hatte wurde die Expression des rekombinanten A.t.-OK1 Proteins durch Zugabe von IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid) bis zu einer
5 Endkonzentration von 1 mM induziert. Nach Zugabe von IPTG wird die Hauptkultur bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von ca. 1,8 erreicht war. Anschließend wurde die Hauptkultur für 30 Minuten auf Eis gekühlt, bevor die Zellen der Hauptkultur durch Zentrifugation (10 Minuten bei 4.000xg und 4°C) vom Kulturmedium abgetrennt wurden.

10

5. Reinigung des rekombinant exprimierten OK1 Proteins

Die Reinigung und Aufkonzentration des A.t.-OK1 Proteins aus Zellen, erhalten nach Beispiel 4, wurde nach dem unter Punkt 4, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren durchgeführt.

15

6. Nachweis von Stärke phosphorylierender Aktivität des OK1 Proteins

Der Nachweis der Stärke phosphorylierenden Aktivität des A.t.-OK1 Proteins erfolgte nach dem unter Punkt 11, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren. Dabei wurden jeweils 5 µg von nach Beispiel 5 hergestelltem, gereinigtem A.t.-OK1 Protein,
20 in einem Ansatz A mit 5 mg Stärke, isoliert aus einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* nach Beispiel 1 b) und in einem Ansatz B mit 5 mg Stärke, erhalten durch enzymatische Phosphorylierung nach Beispiel 1 c) in jeweils 500 µl Phosphorylierungspuffer **enthaltend 0,05 mM** radioaktiv (³³P) markiertes, randomisiertes ATP (insgesamt 1.130.00 cpm, ca. 0,55 µCi) für 30 Minuten bei
25 Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz C, welcher dem Ansatz B entsprach, jedoch kein OK1 Protein enthielt, ansonsten aber in gleicher Weise behandelt wurde, wie die Ansätze A und B. Für alle Ansätze (A, B, C) wurden jeweils zwei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

Mittels Verwendung eines Scintillationszählers wurden die Stärken aus den Ansätzen
30 A, B, und C auf das Vorliegen von radioaktiv markiertem Phosphat hin untersucht

(siehe Punkt 11 b), Allgemeine Methoden). Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und in Fig. 3 dargestellt.

	Gemessene Radioaktivität [cpm]	
	Versuch 1	Versuch 2
Ansatz A (nicht-phosphorylierte Stärke + OK1)	42	47
Ansatz B (phosphorylierte Stärke + OK1)	7921	8226
Ansatz C (phosphorylierte Stärke ohne Protein)	56	53

Tabelle 1: Nachweis einer Stärke phosphorylierenden Aktivität des OK1 Proteins

5

Aus den erhaltenen Ergebnissen ist erkennbar, dass das OK1 Protein keine Phosphatgruppen von ATP auf Stärke überträgt, wenn nicht-phosphorylierte-Stärke als Substrat angeboten wird, da der in cpm gemessene Anteil der durch ein OK1 Protein auf nicht-phosphorylierte-Stärke übertragenen Phosphatgruppen den Anteil der radioaktiv markierten Phosphatgruppen in Ansatz C (Kontrolle) nicht übersteigt. Wird hingegen P-Stärke als Substrat angeboten, ist der in cpm gemessene Anteil an radioaktiven Phosphatgruppen, welcher von ATP auf P-Stärke übertragen wird, signifikant höher. Daraus ist ersichtlich, dass das OK1 Protein P-Stärke als Substart benötigt und dass nicht-phosphorylierte-Stärke nicht als Substart von dem OK1 Protein akzeptiert wird.

15

Wird der oben dargestellte Versuch mit spezifisch in gamma-Position mit ^{33}P markiertem ATP durchgeführt, so kann kein Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat in die Stärke festgestellt werden. Daraus ergibt sich, dass der beta-Phosphatrest des ATP von einem OK1 Protein auf Stärke übertragen wird. Die Ergebnisse eines solchen Versuches sind in Fig. 6 dargestellt.

20

7. Nachweis der Autophosphorylierung

- Der Nachweis der Autophosphorylierung des A.t.-OK1 Proteins erfolgte mittels der weiter oben beschriebenen Methode (siehe Punkt 12, Allgemeine Methoden). Dabei wurden 50 µg gereinigtes A.t.-OK1 Protein mit radioaktiv markiertem, randomisiertem
- 5 ATP in 220 µl Phosphorylierungspuffer (siehe oben, Punkt 12 d), Allgemeine Methoden) bei Raumtemperatur für 60 Minuten unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden den Inkubationsansätzen jeweils 100 µl entnommen und in vier frische Reaktionsgefäße überführt. In Reaktionsgefäß 1 wurde die Reaktion durch Zugabe von je 40 µl 0,11M EDTA gestoppt. Reaktionsgefäß 2 wurde bei 95°C für 5
- 10 Minuten inkubiert. Zu Reaktionsgefäß 3 wurde HCl bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M zugegeben und zu Reaktionsgefäß 4 wurde NaOH bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M zugegeben. Die Reaktionsgefäße 3 und 4 wurden jeweils für 25 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 50 µl der Reaktionsgefäße 1, 2, 3 und 4 entnommen, mit SDS Probenpuffer versetzt und
- 15 mittels SDS-Acrylamidgelelektrophorese (7,5%iges Acrylamidgel) aufgetrennt. Dazu wurden Proben der Reaktionsgefäße auf jeweils zwei identische Acrylamidgele aufgetragen. Eines der nach erfolgter Elektrophorese erhaltenen Gele wurde einer Autoradiographie unterzogen, während das zweite Gel mit Comassie Blau gefärbt wurde.
- 20 In dem mit Comassie Blau gefärbten Gel (siehe Fig. 2A)) ist deutlich zu erkennen, dass die Behandlung mit 0,5 M NaOH zu einem Abbau des OK1 Proteins führt. Das OK1 Protein ist daher als labil gegenüber NaOH zu bezeichnen. Inkubation bei 30°C, 95°C und mit 0,5 M HCl zeigen, dass das OK1 Protein unter den genannten Inkubationsbedingungen relativ stabil ist. Dieses ist daraus zu schließen, dass bei
- 25 diesen Inkubationsbedingungen jeweils etwa gleiche Mengen OK1 Protein nach Comassie Blau Färbung im betreffenden Gel nachgewiesen werden können.
- In der Autoradiographie (siehe Abb. 2B)) ist durch Vergleich mit bei 30°C inkubiertem phosphoryliertem OK1 Protein zu erkennen, dass eine Inkubation des phosphorylierten OK1 Proteins bei 95°C zu einer deutlichen Reduzierung des
- 30 Phosphates, welches an das OK1 Protein gebunden ist, führt. Die Bindung zwischen dem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins ist daher als Hitzelabil zu bezeichnen. Weiterhin ist eine leichte Abnahme des an das OK1 Protein

gebundenen Phosphates ebenfalls bei Inkubation mit 0,5 M HCl und 0,5 M NaOH im Vergleich mit bei 30°C inkubiertem phosphoryliertem OK1 Protein zu beobachten. Wird die Tatsache berücksichtigt, dass die Menge des OK1 Proteins in der Autoradiographie nach Behandlung mit 0,5 M NaOH wegen der Labilität des OK1 Proteins gegenüber NaOH wesentlich geringer ist, als in den mit Hitze und Säure behandelten Proben, so kann geschlossen werden, dass die Bindung zwischen dem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins relativ stabil gegenüber Basen ist. Da die mit Säure behandelte Probe etwa gleiche Proteinmengen wie die bei 30°C und bei 95°C inkubierte Probe enthält, jedoch ein signifikant geringeres Signal als die mit 30°C behandelte Probe in der Autoradiographie aufweist, ist davon auszugehen, dass auch saure Inkubationsbedingungen die Bindung zwischen einem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins zu einem gewissen Maße spalten. Daher konnte in den durchgeführten Versuchen auch eine Labilität der Bindung zwischen einem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins festgestellt werden. Die Labilität gegenüber Säuren ist dabei jedoch wesentlich weniger ausgeprägt als die Labilität gegenüber Hitze.

Bindungen zwischen der Aminosäure Histidin und Phosphat sind Hitzelabil, Säurelabil aber Basestabil (Rosenberg, 1996, Protein Analysis and Purification, Birkhäuser, Boston, 242-244). Die oben beschriebenen Ergebnisse sind daher ein Hinweis darauf, dass durch Autophosphorylierung eines OK1 Proteins ein Phosphohistidin entsteht.

Wird rekombinant exprimiertes OK1 Protein wie oben beschrieben mit spezifisch in gamma-Position mit ^{33}P markiertem ATP inkubiert, so kann keine Autophosphorylierung festgestellt werden. Fig. 5 A) zeigt die Menge an Protein, die nach den betreffenden Inkubationsschritten mittels Western Blot Analyse in dem jeweiligen Reaktionsansatz noch nachgewiesen werden kann. Fig. 5 B) zeigt eine Autoradiographie von Protein aus den einzelnen Reaktionsansätzen. Es ist zu erkennen, dass bei Verwendung von spezifisch in der gamma-Position markiertem ATP keine Autophosphorylierung des OK1 Proteins auftritt, während bei Verwendung von randomisiertem ATP eine Autophosphorylierung nachgewiesen werden kann. Dieses bedeutet, dass bei der Autophosphorylierung eines OK1 Proteins der

Phosphatrest der beta-Position des ATP kovalent an eine Aminosäure des OK1 Proteins gebunden wird.

8. Nachweis der von einem OK 1 Protein phosphorylierten C-Atom-
5 Positionen der Glucosemoleküle von Stärke

a) Herstellung von phosphorylierter-Stärke

Phosphorylierte Stärke wurde nach Punkt 7, Allgemeine Methoden hergestellt. Es wurden dazu in einem Ansatz A 5 mg nicht phosphorylierte Stärke, isoliert aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* mit 25 µg gereinigtem A.t.-
10 OK1 Protein und in einem zweiten Ansatz B 5 mg *in vitro* phosphorylierter-Stärke ursprünglich isoliert aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana*) mit 5 µg gereinigtem R1 Protein eingesetzt. Die Reaktion erfolgte jeweils in 500 µl Phosphorylierungspuffer, der jeweils ³³P markiertes ATP (ca. 2,5 x 10⁶ cpm) enthielt, durch Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Stunde unter Schütteln. Zusätzlich wurde
15 ein Kontrollansatz, welcher 5 mg Stärke, isoliert aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* und den genannten Phosphorylierungspuffer, jedoch kein Protein enthielt, verwendet. Der Kontrollansatz wurde genauso behandelt, wie die Ansätze A und B. Die einzelnen Reaktionen wurden durch Zugabe von jeweils 125 µl 10% SDS gestoppt und mit je 900 µl einmal mit 2% SDS, fünfmal mit 2 mM ATP und
20 zweimal mit H₂O gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgte eine Zentrifugation (jeweils 2 Minuten in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 13.000 rpm). Die erhaltenen Stärkepellets wurden jeweils in 1 ml H₂O resuspendiert und 100 µl jedes Ansatzes wurden nach Zugabe von 3 ml Scintillationscocktail (Ready SafeTM, BECKMANN) versetzt und anschließend mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS
25 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTERTM) vermessen.

Die Messung ergab folgende Ergebnisse:

Kontrolle:	63 cpm/100 µL	630 cpm/1000 µl
Ansatz A (OK1):	1351 cpm/100 µl	13512 cpm/1000 µl
Ansatz B (R1):	3853 cpm/100 µl	38526 cpm/1000 µl

30

b) Totalhydrolyse der P-Stärke

Die nach Schritt a) erhaltenen Suspensionen der Ansätze A, B und C wurden erneut zentrifugiert (5 Minuten in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 13.000 rpm), die erhaltenen Pellets in 90 µl 0,7 M HCl (Baker, zur Analyse) resuspendiert und anschließend für 2 Stunde bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze A, B und C erneut zentrifugiert (5 Minuten in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 13.000 rpm), und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Sedimentierte Rückstände der Ansätze wurden in jeweils 100 µl H₂O resuspendiert und nach Zugabe von je 3 ml Scintillationscocktail (Ready Safe™, BECKMANN) mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTER™) vermessen. In keinem der Rückstände konnten signifikante Mengen an Radioaktivität nachgewiesen werden, was bedeutet, dass sich alle mit radioaktivem Phosphat markierten Hydrolyseprodukte im Überstand befinden.

Danach erfolgte die Neutralisation der einzelnen Überstände, enthaltend die Hydrolyseprodukte, durch Zugabe von jeweils 30 µl 2 M NaOH (die Menge der zur Neutralisation benötigten Menge von NaOH wurde vorher an Blindproben ausgetestet): Die neutralisierten Hydrolyseprodukte wurden auf einen 10 kDa Microcon-Filter, der vorher zweimal mit je 200 µl H₂O gespült wurde, gegeben und für ca. 25 Minuten bei 12.000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Von dem erhaltenen Filtrat (jeweils ca. 120 µl) wurden je 10 µl abgenommen, die nach Zugabe von je 3 ml Scintillationscocktail (Ready Safe™, BECKMANN) mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTER™) vermessen wurden. Die Bestimmung der in den einzelnen Ansätzen vorliegenden Aktivität ergab dabei folgende Ergebnisse:

	Ansatz A (OK1):	934 cpm/10 µl	11.208 cpm/120 µl	93 cpm/µl
25	Ansatz B (R1):	2518 cpm/10 µl	30.216 cpm/120 µl	252 cpm/µl

c) Auftrennung der Hydrolyseprodukte

Die Auftrennung der nach Schritt b) erhaltenen Hydrolyseprodukte wurde mittels HPAE unter Verwendung einer Dionex Anlage unter den oben angegebenen Bedingungen (siehe (Allgemeine Methoden Punkt 13 c)) durchgeführt. Die Proben zur Auftrennung der filtrierten Überstände der Ansätze A und B, erhalten nach Schritt b) waren dazu wie folgt zusammengesetzt:

Ansatz A (OK1): 43 µl des nach Schritt b) erhaltenen Überstand des Ansatzes A (entspricht ca. 4.000 cpm), 32 µl H₂O, 2,5 µl 2,5 mM Glucose-6-Phosphat und 2,5 µl 5 mM Glucose-3-Phosphat (Σ Volumen = 80 µl).

5 Ansatz B (R1): 16 µl des nach Schritt b) erhaltenen Überstand des Ansatzes B (entspricht ca. 4.000 cpm), 59 µl H₂O, 2,5 µl 2,5 mM Glucose-6-Phosphat und 2,5 µl 5 mM Glucose-3-Phosphat (Σ Volumen = 80 µl).

Jeweils 60 µl, enthaltend ca. 3.000 cpm, der entsprechenden Proben wurden zur Auftrennung mittels HPAE injiziert. Die Durchführung der HPAE erfolgte nach den unter Punkt 23 c) angegebenen Bedingungen. Die Elutionspuffer wurden nach
10 Passage der HPAE-Säule in Fraktionen von je 1 ml aufgesammelt. Das Aufsammeln der Fraktionen wurde 10 Minuten nach Injektion der Probe begonnen. Anhand des erhaltenen Signals des eingesetzten PAD Detektors konnte die Elution von Glucose-6-Phosphat der Fraktion 15 und die die Elution von Glucose-3-Phosphat der Fraktion 17 zugeordnet werden. Jeweils 500 µl der einzelnen Fraktionen wurden mit je 3 ml
15 Scintillationscocktail (Ready Safe™, BECKMANN) gemischt und anschließend mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTERTM) vermessen. Für die einzelnen Fraktionen wurden folgende Meßwerte erhalten:

	Gesamt cpm je Fraktion	
	Ansatz (OK1)	AAnsatz (R1)
Fr 13	8,7	3,3
Fr 14	13,1	32,2
Fr 15 (G6P)	207,3	1952,8
Fr 16	399,8	112,3
Fr 17 (G3P)	1749,2	801,6
Fr 18	196,7	17,3
Fr 19	6,7	18,9
Summe	2581,5	2938,3
Auftrag	3000,0	3000,0
Wiederfindung	86,0%	97,9%

Tabelle 4: Gemessene Menge an Radiaktivität [cpm] in einzelnen Fraktionen von Hydrolyseprodukten, erhalten durch Hydrolyse von mittels eines OK1 Proteins oder R1 Proteins phosphorylierten Stärke.

Die Ergebnisse sind auch in Fig. 5 graphisch dargestellt

5

Nach von R1 Protein katalysierter Phosphorylierung von Stärke eluierten nach Hydrolyse der Stärke ca. 66% des radioaktiv markierten Phosphates, bezogen auf das gesamte gemessene radioaktive Phosphat in den analysierten Fraktionen, mit der Fraktion, die Glucose-6-Phosphat als Standard enthielt und ca. 27% mit der

10 Fraktion, die Glucose-3-Phosphat als Standard enthielt. Nach von OK1 Protein katalysierter Phosphorylierung von Stärke, eluierten nach Hydrolyse der Stärke ca. 67% des radioaktiv markierten Phosphates, bezogen auf das gesamte gemessene radioaktive Phosphat in den analysierten Fraktionen, mit der Fraktion, die Glucose-3-Phosphat als Standard enthielt und ca. 8% mit der Fraktion, die Glucose-6-Phosphat

15 als Standard enthielt.. Daraus kann geschlossen werden, dass Glucosemoleküle der Stärke von R1 Proteinen bevorzugt in C-6-Position phosphoryliert werden, während von OK1 Proteinen Glucosemoleküle der Stärke bevorzugt in C-3-Position phosphoryliert werden.

9. Identifizierung eines OK1 Proteins in Reis

Durch Verwendung der unter den Punkten 1 bis 13, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren konnte auch ein Protein aus *Oryza sativa* (Varietät M202) identifiziert werden, welches einen Phosphatrest von ATP auf P-Stärke überträgt.

- 5 Das Protein wurde mit O.s.-OK1 bezeichnet. Nicht-phosphorylierte-Stärke wird von dem O.s.-OK1 Protein nicht als Substrat verwendet, d.h. auch das O.s.-OK1 Protein benötigt P-Stärke als Substrat. Die das identifizierte O.s.-OK1 Protein codierende Nucleinsäuresequenz ist unter SEQ ID NO 3 und die das O.s.-OK1 Protein codierende Aminosäuresequenz ist unter SEQ ID NO. 4 dargestellt. Die unter SEQ
- 10 ID NO 4 dargestellte Aminosäuresequenz codierend das O.s.-OK1 Protein weist eine Identität von 57% mit der unter SEQ ID NO 2 dargestellten Aminosäuresequenz codierend das A.t.-OK1 Protein auf. Die unter SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleinsäuresequenz codierend das O.s.-OK1 Protein weist eine Identität von 61% mit der unter SEQ ID NO 1 dargestellten Nucleinsäuresequenz, codierend das A.t.-
- 15 OK1 Protein auf.

Herstellung des Plasmides pMI50 enthaltend die Nucleinsäuresequenz codierend ein OK1 Protein aus *Oryza sativa*

- Der Vektor pMI50 enthält ein DNA-Fragment welches das vollständige OK1 Protein
- 20 aus Reis der Varietät M202 kodiert.

Die Amplifikation der DNA aus Reis erfolgte in fünf Teilschritten.

1. Der Teil des offenen Leserasters von Position -11 bis Position 288 der unter SEQ DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der
- 25 synthetischen Oligonukleotide Os_ok1-R9 (GGAACCGATAATGCCTACATGCTC) und Os_ok1-F6 (AAACTCGAGGAGGATCAATGACGTCGCTGCGGCCCTC) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML123 bezeichnet.
- 30 2. Der Teil des offenen Leserasters von Position 250 bis Position 949 der unter SEQ DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser

- Transkriptase und der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide Os_ok1-F4 (CCAGGTTAAGTTGGTGAGCA) und Os_ok1-R6 (CAAAGCACGATATCTGACCTGT) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML120 bezeichnet.
- 5
3. Der Teil des offenen Leserasters von Position 839 bis Position 1761 der unter SEQ DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide Os_ok1-F7 (TTGTTTCGCGGGATATTGTCAGA) und Os_ok1-R7 (GACAAGGGCATCAAGAGTAGTATC) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML121 bezeichnet.
- 10
4. Der Teil des offenen Leserasters von Position 1571 bis Position 3241 der unter SEQ DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide Os_ok1-F8 (ATGATGCGCCTGATAATGCT) und Os_ok1-R4 (GGCAAACAGTATGAAGCACGA) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML119 bezeichnet.
- 15
- 20
5. Der Teil des offenen Leserasters von Position 2777 bis Position 3621 wurde mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide Os_ok1-F3 (CATTGGATCAATGGAGGATG) und Os_ok1-R2 (CTATGGCTGTGGCCTGCTTTGCA) als Primer auf genomischer DNA von Reis amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML122 bezeichnet.
- 25
- 30 Die Zusammenklonierung der Teilstücke des offenen Leserasters von OK1 erfolgte folgendermaßen.

Ein 700 Basenpaare langes *Apal*-Fragment aus pML120, einen Teil des offenen Leserasters von OK1 enthaltend wurde in die *Apal*-Schnittstelle von pML121 kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI47 bezeichnet.

Ein 960 Basenpaare langes Fragment enthaltend die für OK1 codierenden Bereiche
5 der Vektoren aus pML120 und pML123 wurde mittels Polymerase Kettenreaktion
amplifiziert. Dabei wurden die Primer Os_ok1-F4 (s. o.) und Os_ok1-R9 (s. o.) je in
einer Konzentration von 50 nm und die Primer Os_ok1-F6 und Os_ok1-R6 je in einer
Konzentration von 500 nm eingesetzt. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den
Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene
10 Plasmid wurde mit pMI44 bezeichnet.

Ein 845 Basenpaare langes Fragment aus pML122 wurde zur Einführung einer *Xho*-
Schnittstelle nach dem Stop-Codon mit den Primern Os_ok1-F3 (s. o.) und Os_ok1-
R2Xho (AAAACTCGAGCTATGGCTGTGGCCTGCTTTGCA) reamplifiziert und in den
Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene
15 Plasmid wurde mit pMI45 bezeichnet.

Ein 1671 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen
Leserasters von OK1 wurde aus pML119 durch Verdau mit den Restriktionsenzymen
SpeI und *PstI* erhalten. Das Fragment wurde in pBluscript II SK+ (Genbank Acc.:
X52328) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI46 bezeichnet.

20 Ein 1706 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen
Leserasters von OK1 wurde mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *XhoI* aus pMI46
herausgeschnitten und in den Vektor pMI45 kloniert, der mit denselben
Restriktionsenzymen geschnitten worden war. Das erhaltene Plasmid wurde mit
pMI47 bezeichnet.

25 Ein 146 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen Leserasters
von OK1 wurde mit den Restriktionsenzymen *AflII/NotI* aus pMI43 herausgeschnitten
und in den Vektor pMI44 kloniert, der mit denselben Restriktionsenzymen
geschnitten worden war. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI49 bezeichnet.

Ein 1657 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen
30 Leserasters von OK1 wurde mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *NarI* aus dem

Vektor pMI49 herausgeschnitten und in den Vektor pMI47 kloniert, der mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten worden war. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI50 bezeichnet und enthält die gesamte codierende Region des in Reis identifizierten OK1 Proteins.

5

10. Herstellung eines Antikörpers, der ein OK1 Protein spezifisch erkennt

Als Antigen wurde ca. 100 µg gereinigtes A.t.-OK1 Protein mittels SDS Gelelektrophorese aufgetrennt, die Proteinbande enthaltend das A.t.-OK1 Protein ausgeschnitten und an die Firma EUROGENTEC S.A. (Belgien) verschickt, die die
10 Herstellung des Antikörpers im Auftrag ausführte. Zunächst wurden die Preimmunseren von Kaninchen dahingehend geprüft, ob sie evtl. bereits vor der Immunisierung mit rekombinantem OK1 ein Protein aus einem A. t. Gesamtextrakt erkennen. Die Preimmunseren zweier Kaninchen erkannten im Bereich 100-150 kDa keine Proteine und wurden daraufhin für die Immunisierung ausgewählt. Pro
15 Kaninchen wurden 4 Injektionen à 100 µg Protein durchgeführt (Tag 0, 14, 28, 56). Je Kaninchen wurden 4 Blutentnahmen durchgeführt: (Tag 38, Tag 66, Tag 87 und die Endblutung). Serum, erhalten nach der ersten Blutung zeigte bereits eine spezifische Reaktion mit OK1 Antigen im Western-Blot. Für alle weiteren Versuche wurde jedoch die letzte Blutung eines Kaninchens verwendet.

20

11. Herstellung transgener Maispflanzen, die eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins aufweisen

- a) Herstellung eines Konstruktes zur Transformation von Maispflanzen, die ein R1 Protein überexprimieren
- 25 Als Ausgangsplasmid zur Herstellung eines Plasmides, welches zur Transformation von Maispflanzen verwendet wurde, diente das Plasmid pMZ12. Diese Plasmid enthält den *ColE1* Origen des Plasmides pBR322) Bolivar et al, 1977, Gene 2, 95-113) und einen bakteriellen Selektionsmarker, der eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Gentamycin vermittelt (Wohlleben et al., 1989, MGG 217, 202-208).
30 Weiterhin enthält dieses Plasmid eine rechte und eine linke T-DNA Border Sequenz.

Zwischen diesen T-DNA Border Sequenzen enthält das Plasmid ein *bar* Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* (White et al., 1990, NAR 18, 1062; EMBL Acc.: X17220), welches Resistenz gegenüber dem Herbizid Glufosinat vermittelt. Die Expression des *bar* Gens wird durch den Promotor des *actin* gens aus Reis (McElroy et al., 1990, Plant Cell 2, 163.171) initiiert. Zur Stabilisierung der Expression des *bar* Gens ist zwischen dem *actin* Promotor und der das *bar* Protein codierenden Sequenz das 1. Intron des *actin* Gens aus Reis (McElroy et al., 1990, Plant Cell 2, 163.171) eingefügt. Nach der das *bar* Protein codierenden Sequenz folgt das Polyadenylierungssignal des Nopalinsynthase Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker et al., 1982, J Mol. Appl. Gent. 1, 561-573).

In das Plasmid pMZ12 wurde der Ubiquitinpromotor aus *Zae mays* (Christensen et al. 1992, Plant Mol. Bio 18, 675-689), gefolgt vom 1. Intron des Ubiquitin Gens aus *Zea mays* (Christensen et al. 1992, Plant Mol. Bio 18, 675-689), gefolgt von der codierenden Sequenz des R1 Gens aus *Solanum tuberosum* (siehe SEQ ID NO 10), gefolgt von dem Polyadenylierungssignal des Nopalinsynthase Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker et al., 1982, J Mol. Appl. Gent. 1, 561-573) zwischen die linke und rechte T-DNA Border Sequenz eingefügt. Das erhaltene Plasmid wurde mit pHN3-146 bezeichnet.

20 b) Transformation von Maispflanzen mit dem Plasmid pHN3-146

Zehn Tage nach Pollination wurden unreife Embryonen von Maispflanzen isoliert und mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens*, enthaltend das Plasmid pHN3-146 als Cointegrat, nach der bei Ishida et al. (1996, Nature Biotechnology 14, 745-750) beschriebenen Methode transformiert. Aus dieser Transformation hervorgegangene so genannte T0 Pflanzen wurden im Gewächshaus angezogen.

c) Identifizierung von Maispflanzen, die eine erhöhte Expression des S.t.-R1 Proteins aus *Solanum tuberosum* aufweisen

Es konnten mittels Quantitativer RT PCR Analyse Pflanzen identifiziert werden, die eine Expression von mRNA, codierend das S.t.-R1 Protein, aufwiesen.

d) Herstellung des Plasmides pUbi-A.t.-OK1

Zunächst wurde das Plasmid pIR96 hergestellt. Das Plasmid pIR96 wurde erhalten, indem ein synthetisches Stück DNA bestehend aus den beiden Oligonukleotiden X1 (TGCAGGCTGCAGAGCTCCTAGGCTCGAGTTAACACTAGTAAGCTTAATTAAGAT ATCATTAC) und X2 (AATTGTAAATGATATCTTAATTAAGCTTACTAGTGTTAACTCGAGCCTAGGAGCT CTGCAGCCTGCA) in den mit *SdaI* und *MunI* geschnittenen Vektor pGSV71 kloniert wurde. Das erhaltene Plasmid wurde mit *SdaI* geschnitten und die überstehenden 3'-Enden mit T4 DNA Polymerase geglättet. Das erhaltene Plasmid wurde mit *SdaI* geschnitten, die überstehenden 3'-Enden mit T4 DNA Polymerase geglättet und ein 197 Basenpaare großes, mittels T4 DNA-Polymerase geglättetes HindIII / SphI Fragment aus pBinAR (Höfgen und Willmitzer, 1990, Plant Science 66, 221-230), enthaltend das Terminationssignal des Octopinsynthase Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*, eingefügt. Das erhaltene Plasmid wurde mit pIR96 bezeichnet.

pGSV71 ist ein Derivat des Plasmides pGSV7, welches sich vom intermediären Vektor pGSV1 ableitet. pGSV1 stellt ein Derivat von pGSC1700 dar, dessen Konstruktion von Cornelissen und Vanderwiele (Nucleic Acid Research 17, (1989), 19-25) beschrieben wurde. pGSV1 wurde aus pGSC1700 erhalten, durch Deletion des Carbenicillin Resistenzgens, sowie Deletion der T-DNA-Sequenzen der TL-DNA-Region des Plasmides pTiB6S3.

pGSV7 enthält den Replikationsursprung des Plasmides pBR322 (Bolivar et al., Gene 2, (1977), 95-113) sowie den Replikationsursprung des Pseudomonas-Plasmides pVS1 (Itoh et al., Plasmid 11, (1984), 206). pGSV7 enthält außerdem das selektierbare Markergen *aadA*, aus dem Transposon Tn1331 aus *Klebsiella pneumoniae*, welches Resistenz gegenüber den Antibiotika Spectinomycin und Streptomycin verleiht (Tolmasky, Plasmid 24 (3), (1990), 218-226; Tolmasky and Crosa, Plasmid 29(1), (1993), 31-40)

Das Plasmid pGSV71 wurde erhalten durch Klonierung eines chimären *bar*-Gens zwischen die Borderregionen von pGSV7. Das chimäre *bar*-Gen enthält die Promotorsequenz des Blumenkohlmosaikvirus zur Initiation der Transkription (Odell et al., Nature 313, (1985), 180), das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson et al., 1987, EMBO J. 6, 2519-2523) und den 3'-untranslatierten Bereich des Nopalinsynthasegens der T-DNA von pTiT37, zur Termination der Transkription

und Polyadenylierung. Das bar-Gen vermittelt Toleranz gegenüber dem Herbizid Glufosinat-Ammonium.

Ein 1986 Basenpaare langes Fragment enthaltend den Promoter des Polyubiquitin-Gens aus Mais (EMBLK Acc.: 94464, Christensen et al., 1992, Plant Mol. Biol. 18: 5 675-689) wurde als *Pst*I-Fragment in pBluescript II SK+ kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pSK-ubq bezeichnet.

Das Plasmid A.t.-OK1-pGEM wurde mit dem Restriktionsenzymen *Bsp*120I geschnitten, mit T4-DNA-Polymerase die Enden geglättet und mit *Sac*I nachgeschnitten. Das DNA-Fragment kodierend das OK1 Protein aus *Arabidopsis* 10 *thaliana* wurde in das Plasmid pSK-ubq kloniert, welches mit *Sma*I und *Sac*I geschnitten war. Das erhaltene Plasmid wurde mit pSK-ubq-ok1 bezeichnet.

Aus dem Plasmid pSK-ubq-ok1 wurde ein Fragment isoliert, welches den Ubiquitin-Promoter aus Mais und das vollständige offene Leseraster für das A.t.-OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* enthielt. Dazu wurde das Plasmid mit dem 15 Restriktionsenzym *Asp*718I geschnitten, die Enden mit T4 DNA Polymerase aufgefüllt und mit *Sda*I nachgeschnitten. Das erhaltene, 5799 Basenpaare große Fragment wurde in das mit *Eco*RV und *Pst*I geschnittene Plasmid pIR96 kloniert. Das aus dieser Klonierung erhaltene Plasmid wurde mit pUbi-A.t.-OK1 bezeichnet.

20 e) Transformation von Maispflanzen mit dem Plasmid pUbi-A.t.-OK1
Zehn Tage nach Pollination wurden unreife Embryonen von Maispflanzen isoliert und mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens*, enthaltend das Plasmid pUbi-A.t.-OK1 als Cointegrat, nach der bei Ishida et al. (1996, Nature Biotechnology 14, 745-750) beschriebenen Methode transformiert. Aus dieser Transformation hervorgegangene 25 so genannte T0 Pflanzen wurden im Gewächshaus angezogen.

f) Identifizierung von Maispflanzen, die eine erhöhte Expression des A.t.-OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana* aufweisen
Es konnten mittels Quantitativer RT PCR Analyse Pflanzen identifiziert werden, die 30 eine Expression von mRNA, codierend das A.t.-OK1 Protein, aufwiesen.

- g) Erzeugung von homozygoten Pflanzen, die eine erhöhte Expression des S.t.-R1 Proteins oder des A.t.-OK1 Proteins aufweisen

T1 Pflanzen, die eine Expression des S.t.-R1 Proteins oder des A.t.-OK1 Proteins aufwiesen, wurden Samen der einzelnen Pflanzen geerntet und jeweils ca. 30
5 Samen pro Pflanze erneut ausgelegt und im Gewächshaus kultiviert. Pflanzen dieser T1 Generation wurden im Dreiblattstadium mit einer Lösung, enthaltend 0,5% Basta® besprüht. Es wurden nur solche Gruppen von T1 Pflanzen weiterverfolgt, bei welchen ca. 25% der jeweils 30 kultivierten Pflanzen nach Sprühen mit der Basta® Lösung abstarben, da es sich bei diesen Pflanzen um solche handelt, bei welchen
10 die Integration der betreffenden T-DNA des Plasmides pHN3-146 oder pUbi-A.t.-OK1 an einem Locus im Genom vorliegt. Aus Blattmaterial von den ca. 75% der Pflanzen, die das Sprühen mit Basta® Lösung überlebten, wurde jeweils genomische DNA isoliert und mittels Invader® Technology (Pielberg et al. 2003, Genome Res.;13, 2171-2177) auf die jeweils vorliegende Kopienzahl hin untersucht. Bei T1 Pflanzen,
15 die innerhalb einer Gruppe von Nachkommen einer T0 Pflanze, bei der Analyse mittels Invader® Technologie ein etwa doppelt so starkes Signal ergaben, wie die restlichen Nachkommen der gleichen T0 Pflanze, sind homozygot bezüglich des Locus, an welchem die T-DNA des betreffenden Plasmides integriert ist. Weisen ca. 30% der Nachkommen einer T0 Pflanze, die die Behandlung mit Basta® Lösung
20 überlebt haben ein etwa doppelt so starkes Signal in der Analyse mittels Invader® Technologie auf, im Vergleich zu den restlichen ca.70% der Nachkommen der gleichen T0 Pflanze, so ist dieses ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich um die Integration der T-DNA an einem einzigen Locus handelt.

- 25 h) Erzeugung von Pflanzen, die sowohl eine erhöhte Expression des S.t.-R1 Proteins, als auch eine erhöhte Expression des A.t.-OK1 Proteins aufweisen

T1 Pflanzen, die eine erhöhte Expression eines S.t.-R1 Proteins aufwiesen und die nach der unter g) beschriebenen Analyse homozygot bezüglich der Integration der T-
30 DNA des Plasmides pHN3-146 sind und in welchen die Integration an einem Locus im Genom der Pflanze vorliegt, wurden mit T1 Pflanzen, die eine erhöhte Expression eines A.t.-OK1 Proteins aufwiesen und nach der unter g) beschriebenen Analyse

homozygot bezüglich der Integration der T-DNA des Plasmides pUbi-A.t.-OK1 sind und in welchen die Integration an einem Locus im Genom der Pflanze vorliegt, gekreuzt. Die Nachkommen dieser Kreuzungen weisen sowohl eine erhöhte Expression des S.t.-R1 Proteins, als auch eine erhöhte Expression des A.t.-OK1
5 Proteins auf.

i) Analyse der Körner von transgenen Maispflanzen und der von diesen synthetisierten Stärke

Aus den unter h) beschriebenen Kreuzungen hervorgegangenen Körnern der
10 betreffenden Mais Pflanzen wurde Stärke isoliert. Die Stärke aus Körnern, die eine erhöhte Expression des S.t.-R1 Proteins und eine erhöhte Expression des A.t.-OK1 Proteins aufwiesen, enthielt mehr kovalent an die Stärke gebundenes Phosphat, als Stärke, isoliert aus nicht transformierten Wildtyp-Pflanzen.

Stärke, isoliert aus Körnern, die eine erhöhte Expression des S.t.-R1 Proteins und
15 eine erhöhte Expression des A.t.-OK1 Proteins aufwiesen, enthielt ebenfalls mehr kovalent an die Stärke gebundenes Phosphat, als Stärke, isoliert aus Pflanzen, die nur eine erhöhte Expression des S.t.-R1 Proteins oder nur eine erhöhte Expression des A.t.-OK1 Proteins aufwiesen.

20 **12. Herstellung transgener Weizenpflanzen, die eine erhöhte Expression eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins aufweisen**

a) Herstellung von transgenen Weizenpflanzen, die ein R1 Protein überexprimieren

Die Herstellung von Weizenpflanzen, welche eine erhöhte Expression des R1
25 Proteins von Kartoffel aufweisen, wurde in WO 02 34923 beschrieben. Die dort beschriebenen Pflanzen wurden teilweise als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Pflanzen, die eine erhöhte Expression eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins aufweisen, eingesetzt.

30 b) Herstellung eines Plasmides zur Transformation von Weizenpflanzen, die ein OK1 Protein überexprimieren

pMCS5 (Mobitec, www.mobitec.de) wurde mit *Bgl*III und *Bam*HI verdaut und religiert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML4 bezeichnet.

Der *nos*-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker et al., 1982, Journal of Molecular and Applied Genetics 1: 561-573) wurde mit den Primern P9
5 (ACTTCTgCAGCggCCgCgATCgTTCAAACATTTggCAATAAAgTTTC) und P10
(TCTAAgCTTggCgCCgCTAgCAGATCTgATCTAgTAACATAgATgACACC)
amplifiziert (25 Zyklen, 30 sec 94 °C, 30 sec 58 °C, 30 sec 72 °C), mit *Hind*III und *Pst*I verdaut und in das mit den gleichen Enzymen geschnittene Plasmid pML4 kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML4-*nos* bezeichnet. In diesen Vektor
10 wurde ein 1986 Basenpaare langes Fragment enthaltend den Promoter des Polyubiquitin-Gens aus Mais (Genbank Acc.: 94464, Christensen et al., 1992, Plant Mol. Biol. 18: 675-689) und dem durch Verdau mit *Cl*aI und Religation verkürzten ersten Intron desselben Gens kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML8 bezeichnet.

15 In das Plasmid pML8 wurde das vollständige offene Leseraster von OK1 aus *Arabidopsis thaliana* kloniert. Dazu wurde das entsprechende Fragment mit *Bsp*120I/*Not*I aus A.t.-OK1-pGEM herausgeschnitten und in *sense* Orientierung in die *Not*I-Schnittstelle von pML8 ligiert.

Aus dem erhaltenen Vektor pML8-A.t.-OK1 kann mit den Restriktionsenzymen *Avr*II
20 und *Swa*I ein Fragment für die Transformation von Weizenpflanzen herausgeschnitten werden, welches den Promoter des Polyubiquitin-Gens aus Mais, das vollständige offene Leseraster von OK1 aus *Arabidopsis thaliana* und den *nos*-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens* enthält.

25 c) Herstellung eines Plasmides zur Erzeugung von Weizenpflanzen, die ein R1 Protein überexprimieren

Es wurde ein Plasmid hergestellt indem das DNA-Fragment welches für das vollständige R1-Protein aus Kartoffel codiert, zwischen zwei Erkennungsschnittstellen für das Restriktionsenzym *Pac*I liegt. Dazu wurde die
30 *Multiple Cloning Site* aus dem Plasmid pBluescript II SK+ mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion und den beiden Oligonukleotiden MCS1-1
(TTTTTGCGCGCGTTAATTAACGACTCACTATAGGGCGA) und MCS1-2

(TTTTTGCGCGCTTAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAG) amplifiziert, mit dem Restriktionsenzym *Bss*HII nachgeschnitten und in den mit *Bss*HII geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pBluescript II SK+ (Invitrogen) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pSK-Pac bezeichnet.

- 5 In den Vektor pSK-Pac wurde ein *Not*I-Fragment kloniert, welches aus dem Klon pRL2 (WO 9711188) erhalten wurde. Das *Not*I Fragment enthält das vollständige offene Leseraster für das R1-Protein aus Kartoffel. Das erhaltene Plasmid wurde mit pIR1 bezeichnet.

- Aus pSK-ubq (siehe oben) wurde mit den Restriktionsenzymen *Eco*RV und *Sma*I ein
10 Fragment herausgeschnitten, welches den Ubiquitin-Promoter und das verkürzte erste Intron enthielt und in die *Eco*RV-Schnittstelle des Plasmids pIR96 kloniert. In das erhaltene Plasmid wurde in sense Orientierung zum Promoter ein *Pac*I-Fragment aus pIR1 kloniert, welches das vollständige offene Leseraster kodierend für das R1-Protein aus Kartoffel enthält. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML82 bezeichnet.

15

- d) Transformation von Weizenpflanzen zur Überexpression von einem OK1 Protein

- Weizenpflanzen der Varietät Florida wurden mit aus einem Agarosegel ausgeschnittenen Fragment, welches mit den Restriktionsenzymen *Avr*II und *Swa*I
20 aus dem Plasmid pML8-A.t.-OK1 herausgeschnitten wurde und den Promoter des Polyubiquitin-Gens aus Mais, das vollständige offene Leseraster von OK1 aus *Arabidopsis thaliana* und den *nos*-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens* enthält, zusammen mit dem Plasmid pGSV71 mittels der biolistischen Methode nach der bei Becker et al. (1994, Plant Journal 5, 299-307) beschriebenen Methode
25 transformiert. Die erhaltenen Pflanzen wurden mit TA-OK1 bezeichnet.

- e) Transformation von Weizenpflanzen zur Überexpression von einem R1 Protein
Weizenpflanzen der Varietät Florida wurden mit dem Plasmid pML82 mittels der biolistischen Methode nach der bei Becker et al. (1994, Plant Journal 5, 299-307)
30 beschriebenen Methode transformiert. Die erhaltenen Pflanzen wurden mit TA-R1 bezeichnet.

- f) Cotransformation von Weizenpflanzen zur Überexpression eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins

Weizenpflanzen der Varietät Florida wurden mit einem DNA Gemisch, enthaltend das Plasmid pML82 und ein mittels HPLC gereinigtes Fragment, welches mit den
5 Restriktionsenzymen *AvrII* und *SwaI* aus dem Plasmid pML8-A.t.-OK1 herausgeschnitten wurde und den Promoter des Polyubiquitin-Gens aus Mais, das vollständige offene Leseraster von OK1 aus *Arabidopsis thaliana* und den *nos*-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens* enthält, mittels der biolistischen Methode nach der bei Becker et al. (1994, Plant Journal 5, 299-307) beschriebenen Methode
10 transformiert. Mit Hilfe von RT-PCR wurden Pflanzen identifiziert, die sowohl eine Expression des A.t.-Ok1 Proteins, als auch eine Expression des S.t.-R1 Proteins aufwiesen. Die erhaltenen Pflanzen wurden mit TA-R1-OK1 bezeichnet.

- g) Identifizierung von transgenen Weizenpflanzen

15 T1 Pflanzen der Linien TA-R1 und TA-OK1 wurden im Gewächshaus kultiviert und vor der Blüte mit Basta® (0,5%ige Lösung) besprüht. Pflanzen, die das Basta® vermittelnde Resistenzgen nicht exprimieren starben ab.

h) Herstellung von Weizenpflanzen, die eine Expression eines S.t.-R1 Proteins
20 und eine Expression eines A.t.-OK1 Proteins aufweisen, mittels Kreuzung TA-OK1 Pflanzen, die die Behandlung mit Basta® überlebten, wurden entweder mit TA-R1 Pflanzen, die die Behandlung mit Basta® überlebten oder mit homozygoten Pflanzen der in WO 02 034923 beschriebenen Linie 40A-11-8 gekreuzt. Die erhaltenen Nachkommen wurden mit TA-Ok1xTA-R1 bzw. mit TA-OK1x40A-11-8
25 bezeichnet.

- e) Analyse der transgenen Weizenpflanzen und der von diesen synthetisierten Stärke

Aus durch Kreuzungen der Linien TA-Ok1 und TA-R1 bzw. TA-OK1 und 40A-11-8
30 hervorgegangenen Körnern wurde Stärke isoliert und der Gehalt an kovalent an die Stärke gebundenem Phosphat bestimmt. Der Phosphatgehalt von Stärke, die aus Körnern, entstanden aus den Kreuzungen TA-Ok1 und TA-R1 bzw. TA-OK1 und

40A-11-8 isoliert wurde, war bei einigen Pflanzen deutlich höher, als bei Stärke, die aus Körnern von entsprechenden Wildtyp-Pflanzen oder aus Pflanzen der Linie 40A-11-8 isoliert wurde.

Für die Analyse der Stärke aus verschiedenen TA-R1-OK1 Linien wurden Körner der
5 jeweiligen Pflanzen geerntet und der C-6-Phosphatgehalt und der C-3-Phosphatgehalt der isolierten Stärke analysiert. Es konnten einige Pflanzen identifiziert werden, bei welchen der Gehalt an C-6-Phosphat plus C-3-Phosphat deutlich erhöht war im Vergleich zu dem Gehalt an C-6-Phosphat plus C-3-Phosphat von Stärke, isoliert aus Körnern der Linien TA-R1 oder 40A-11-8.

10

13. Herstellung transgener Reispflanzen, die eine erhöhte Expression eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins aufweisen

a) Herstellung des Plasmides pGlo-A.t.-OK1

Das Plasmid pIR94 wurde erhalten indem der Promoter des Globulin-Gens aus Reis
15 durch eine Polymerase Kettenreaktion (30 x 20 sec 94 °C, 20 sec 62 °C, 1 min 68 °C,
4 mM Mg₂SO₄) mit den Primern glb1-F2
(AAAACAATTGGCGCCTGGAGGGAGGAGA) und glb1-R1
(AAAACAATTGATGATCAATCAGACAATCACTAGAA) auf genomischer DNA von
Reis der Varietät M202 mit High Fidelity Taq Polymerase (Invitrogen, Katalognummer
20 11304-011) amplifiziert und in pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert wurde.

Das Plasmid pIR115 wurde erhalten indem eine synthetisches Stück DNA bestehend
aus den beiden Oligonukleotiden X1
(TGCAGGCTGCAGAGCTCCTAGGCTCGAGTTAACTAGTAAGCTTAATTAAGAT
25 ATCATTAC) und X2
(AATTGTAAATGATATCTTAATTAAGCTTACTAGTGTTAACTCGAGCCTAGGAGCT
CTGCAGCCTGCA) in den mit *SdaI* und *MunI* geschnittenen Vektor pGSV71 kloniert wurde.

Das erhaltene Plasmid pIR115 wurde mit *SdaI* geschnitten, die überstehenden 3'-
30 Enden mit T4 DNA Polymerase geglättet und ein 197 Basenpaare großes, mittels T4
DNA-Polymerase geglättetes *HindIII* / *SphI* Fragment aus pBinAR (Höfgen und

Willmitzer, 1990, Plant Science 66, 221-230), enthaltend das Terminationssignal des Octopinsynthase Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*, eingefügt. Das erhaltene Plasmid wurde mit pIR96 bezeichnet.

Das Plasmid pIR103 wurde erhalten, indem ein 986 Basenpaare langes DNA
5 Fragment aus pIR94, enthaltend den Promoter des Globulin-Gens aus Reis, kloniert in das Plasmid pIR96 kloniert wurde.

pGSV71 ist ein Derivat des Plasmides pGSV7, welches sich vom intermediären Vektor pGSV1 ableitet. pGSV1 stellt ein Derivat von pGSC1700 dar, dessen Konstruktion von Cornelissen und Vanderwiele (Nucleic Acid Research 17, (1989),
10 19-25) beschrieben wurde. pGSV1 wurde aus pGSC1700 erhalten, durch Deletion des Carbenicillin Resistenzgen, sowie Deletion der T-DNA-Sequenzen der TL-DNA-Region des Plasmides pTiB6S3.

pGSV7 enthält den Replikationsursprung des Plasmides pBR322 (Bolivar et al., Gene 2, (1977), 95-113) sowie den Replikationsursprung des *Pseudomonas*-
15 Plasmides pVS1 (Itoh et al., Plasmid 11, (1984), 206). pGSV7 enthält außerdem das selektierbare Markergen *aadA*, aus dem Transposon Tn1331 aus *Klebsiella pneumoniae*, welches Resistenz gegenüber den Antibiotika Spectinomycin und Streptomycin verleiht (Tolmasky, Plasmid 24 (3), (1990), 218-226; Tolmasky and Crosa, Plasmid 29(1), (1993), 31-40)

20 Das Plasmid pGSV71 wurde erhalten durch Klonierung eines chimären *bar*-Gens zwischen die Borderregionen von pGSV7. Das chimäre *bar*-Gen enthält die Promotorsequenz des Blumenkohlmosaikvirus zur Initiation der Transkription (Odell et al., Nature 313, (1985), 180), das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson et al., Embo J. 6, (1987), 2519-2523) und den 3'-untranslatierten Bereich
25 des Nopalinsynthasegens der T-DNA von pTiT37, zur Termination der Transkription und Polyadenylierung. Das *bar*-Gen vermittelt Toleranz gegenüber dem Herbizid Glufosinat-Ammonium.

Ein DNA-Fragment, welches die Sequenz des vollständigen offenen Leserasters des OK1 Proteins aus *Arabidopsis* enthält, wurde aus dem Vektor A.t.-OK1-pGEM
30 herausgeschnitten und in den Vektor pIR103 kloniert. Dazu wurde das Plasmid A.t.-OK1-pGEM mit dem Restriktionsenzymen *Bsp120I* geschnitten, mit T4-DNA-Polymerase die Enden geglättet und mit *SalI* nachgeschnitten. Das DNA-Fragment

kodierend das OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* wurde in den mit *Ecl*136II und *Xho*I geschnittenen Vektor pIR103 kloniert. Das erhaltene Plamid wurde mit pGlo-A.t.-OK1 bezeichnet.

- 5 b) Transformation von Reispflanzen mit dem Plasmid pGlo-A.t.-OK1
Reispflanzen (Varietät M202) wurden mittels *Agrobacterium* (enthaltend das Plasmid pGlo-A.t.-OK1) unter Verwendung der bei Hiei et al. (1994, Plant Journal 6(2), 271-282) beschriebenen Methode transformiert.

- 10 c) Analyse der transgenen Reispflanzen, die mit dem Plasmid pGlo-A.t.-OK1 transformiert wurden
Es konnten mittels Quantitativer RT PCR Analyse Pflanzen identifiziert werden, die eine Expression von mRNA, codierend das A.t.-OK1 Protein, aufwiesen. Homozygote Pflanzen der T1 Generation wurden wie oben in Beispiel 11. g) anhand
15 von Maispflanzen beschrieben, identifiziert. Die erhaltenen Pflanzen wurden mit OS-OK1 bezeichnet.

- d) Transformation von Reispflanzen mit dem Plasmid pML82
Reispflanzen (Varietät M202) wurden mittels *Agrobacterium* (enthaltend das Plasmid
20 pML82) unter Verwendung der bei Hiei et al. (1994, Plant Journal 6(2), 271-282) beschriebenen Methode transformiert.

- e) Analyse der transgenen Reispflanzen, die mit dem Plasmid pGloML82 transformiert wurden
25 Es konnten mittels Quantitativer RT PCR Analyse Pflanzen identifiziert werden, die eine Expression von mRNA, codierend das S.t.-R1 Protein, aufwiesen. Homozygote Pflanzen der T1 Generation wurden wie oben in Beispiel 11. g) anhand von Maispflanzen beschrieben, identifiziert. Die erhaltenen Pflanzen wurden mit OS-R1 bezeichnet.

30

- f) Herstellung von Reispflanzen, die eine Expression eines S.t.-R1 Proteins und eine Expression eines A.t.-OK1 Proteins aufweisen, mittels Kreuzung.

Homozygote OS-OK1 Pflanzen wurden entweder mit homozygoten OS-R1 Pflanzen, gekreuzt. Die erhaltenen Nachkommen wurden mit OS-Ok1xOS-R1 bezeichnet.

- g) Analyse der transgenen Reispflanzen und der von diesen synthetisierten Stärke
- 5 Aus den durch Kreuzungen hervorgegangenen OS-Ok1xOS-R1 Körnern wurde Stärke isoliert und der Gehalt an kovalent an die Stärke gebundenem Phosphat bestimmt. Der Phosphatgehalt in C-6-Position und in C-3-Position der Glucosemoleküle von Stärke, die aus Körnern, entstanden aus den Kreuzungen der Linien OS-Ok1 und OS-R1 isoliert wurde, war bei einigen Linien deutlich höher, als
- 10 bei Stärke, die aus Körnern von entsprechenden Wildtyp-Pflanzen oder aus Pflanzen der Linien OS-R1 isoliert wurde.

Patentansprüche

1. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine erhöhte Aktivität mindestens eines OK1 Proteins und mindestens eines R1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen aufweist.
2. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 1, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls, in das Genom der Pflanze besteht.
3. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 2, wobei mindestens ein fremdes Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein codiert.
4. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 2, wobei mindestens ein fremdes Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein codiert.
5. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 2, wobei ein erstes fremdes Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein codiert und ein zweites fremdes Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein codiert.
6. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 4 oder 5, wobei besagtes fremdes, ein R1 Protein codierendes, Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein aus Kartoffel, Weizen, Mais, Reis, Soyabohne, Citrus oder *Arabidopsis* codiert.
7. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 6, die eine modifizierte Stärke synthetisiert im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen.
8. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 7, wobei die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie einen erhöhten Gehalt an Stärkephosphat und/oder eine veränderte Phosphatverteilung aufweist, im Vergleich zu Stärke, isoliert aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen.
9. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 8, wobei die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie ein verändertes Verhältnis von C-3-Phosphat zu C-6-Phosphat aufweist.

10. Pflanze enthaltend genetisch modifizierte Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
11. Pflanze nach Anspruch 10, die eine Stärke speichernde Pflanze ist.
12. Pflanze nach Anspruch 11, die eine Maispflanze oder Weizenpflanze ist.
13. Vermehrungsmaterial von Pflanzen nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12, enthaltend genetisch modifizierte Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
14. Erntebare Pflanzenteile von Pflanzen nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12, enthaltend genetisch modifizierte Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
15. Verfahren zur Herstellung einer genetisch modifizierten Pflanze nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12, worin
 - a) eine Pflanzenzelle genetisch modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen führt;
 - b) aus Pflanzenzellen von Schritt a) eine Pflanze regeneriert wird; und
 - c) gegebenenfalls weitere Pflanzen mit Hilfe der Pflanzen nach Schritt b) erzeugt werden.
16. Verfahren nach Anspruch 15, worin die genetische Modifikation in der Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom der Pflanzenzelle besteht.
17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei mindestens ein besagtes fremdes Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein codiert.
18. Verfahren nach Anspruch 16, wobei mindestens ein besagtes fremdes Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein codiert.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 18, worin die genetisch modifizierte Pflanze im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen eine modifizierte Stärke synthetisiert.

20. Verfahren nach Anspruch 19, worin die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie einen erhöhten Gehalt an kovalent an die Stärke gebundenem Phosphat aufweist.
21. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, worin die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie ein verändertes Verhältnis von C-3-Phosphat zu C-6-Phosphat aufweist.
22. Modifizierte Stärke erhältlich aus einer genetisch modifizierten Pflanze nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12, aus Vermehrungsmaterial nach Anspruch 13 oder aus erntebaren Pflanzenteilen nach Anspruch 14.
23. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer genetisch modifizierten Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
24. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer Pflanze nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12.
25. Verwendung von Pflanzen nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12 zur Herstellung einer modifizierten Stärke.
26. Modifizierte Stärke erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 23 oder 24.
27. Verfahren zur Herstellung einer derivatisierten Stärke, worin modifizierte Stärke nach Anspruch 22 oder 26 derivatisiert wird.
28. Derivatisierte Stärke erhältlich nach einem Verfahren nach Anspruch 27.
29. Verwendung von modifizierter Stärke nach einem der Ansprüche 22 oder 26 zur Herstellung von derivatisierter Stärke.
30. Mehle, enthaltend modifizierte Stärke nach Anspruch 22 oder 26.
31. Mehle, erhältlich aus Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 9, aus Teilen von Pflanzen nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12, aus Vermehrungsmaterial nach Anspruch 13 oder aus erntebaren Pflanzenteilen nach Anspruch 14.

32. Verfahren zur Herstellung von Mehlen, umfassend den Schritt des Mahlens von Pflanzenteilen von Pflanzen nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12 oder von Vermehrungsmaterial nach Anspruch 13 oder erntebarem Material nach Anspruch 14.
33. Verwendung von genetisch modifizierten Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder von Pflanzen nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12 zur Herstellung von Mehlen.
34. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül enthaltend ein Nucleinsäuremolekül codierend ein OK1 Protein und ein Nucleinsäuremolekül codierend ein R1 Protein.
35. Vektor enthaltend ein rekombinantes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 34.
36. Vektor nach Anspruch 35, wobei die rekombinanten Nucleinsäuremoleküle mit regulatorischen Sequenzen verknüpft sind, die die Transkription in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen initiieren.
37. Wirtszelle, die genetisch modifiziert ist mit einem rekombinanten Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 34 oder mit einem Vektor nach einem der Ansprüche 35 oder 36.
38. Zusammensetzung enthaltend ein rekombinantes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 34 oder einen Vektor nach einem der Ansprüche 35 oder 36.
39. Zusammensetzung enthaltend eine Nucleinsäuresequenz codierend ein OK1 Protein und eine Nucleinsäuresequenz codierend ein R1 Protein.
40. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 38 oder 39 zur Transformation von Pflanzenzellen.

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

1/5

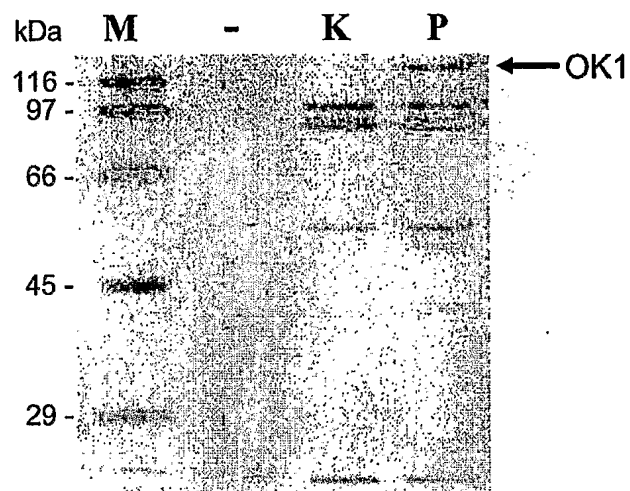


Fig. 1

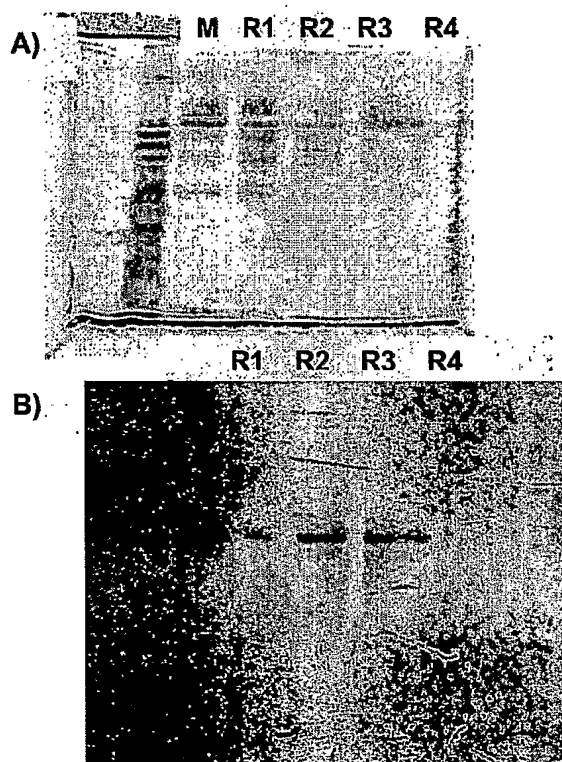


Fig. 2

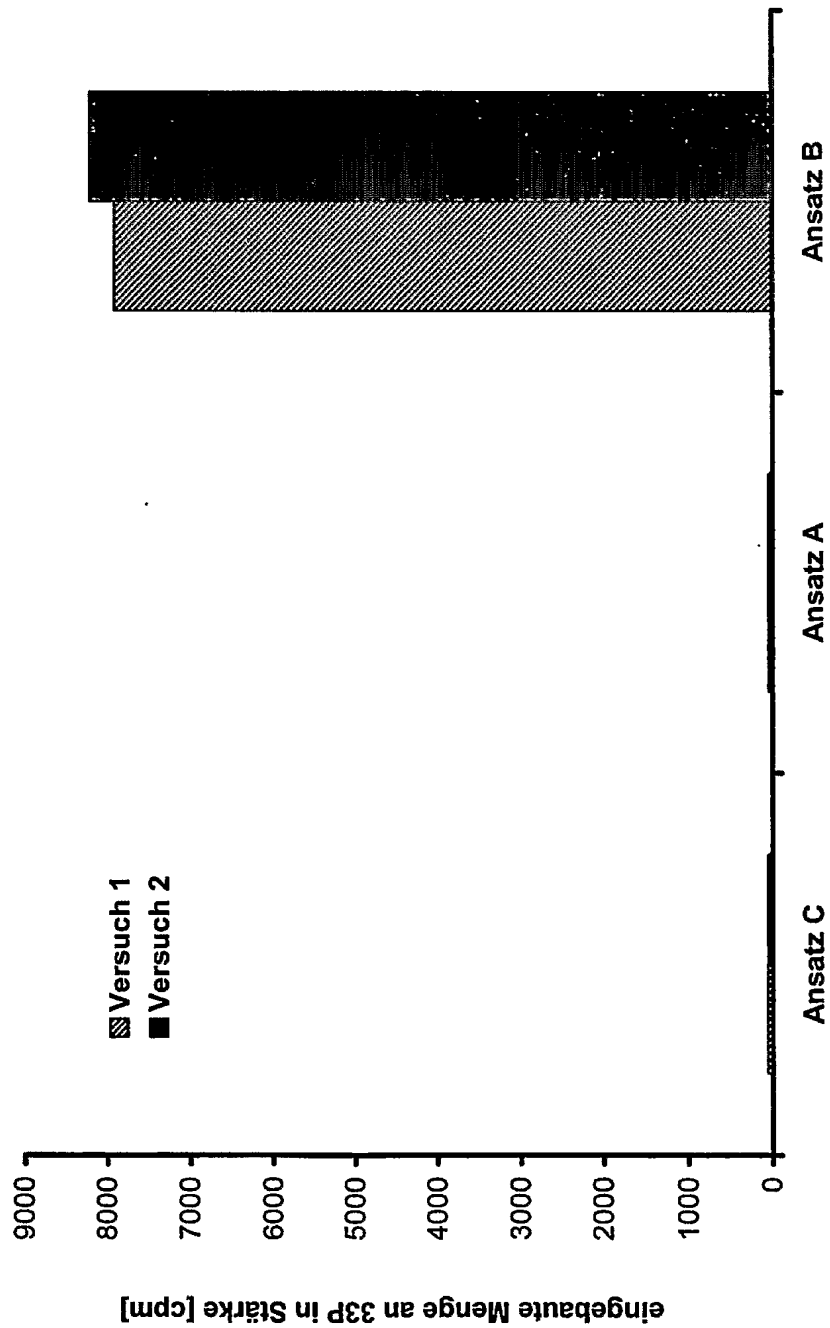


Fig.: 3

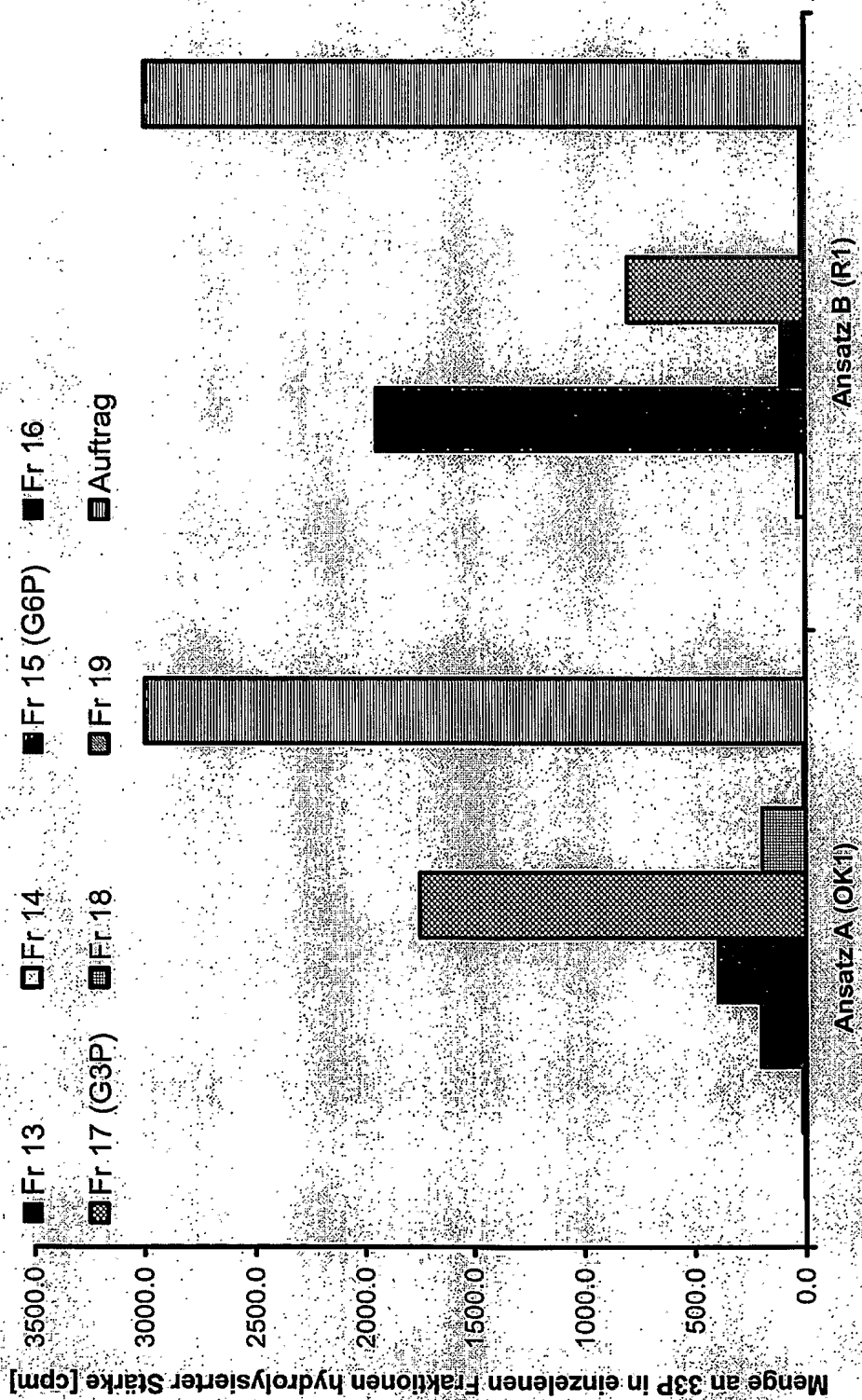


Fig. 4

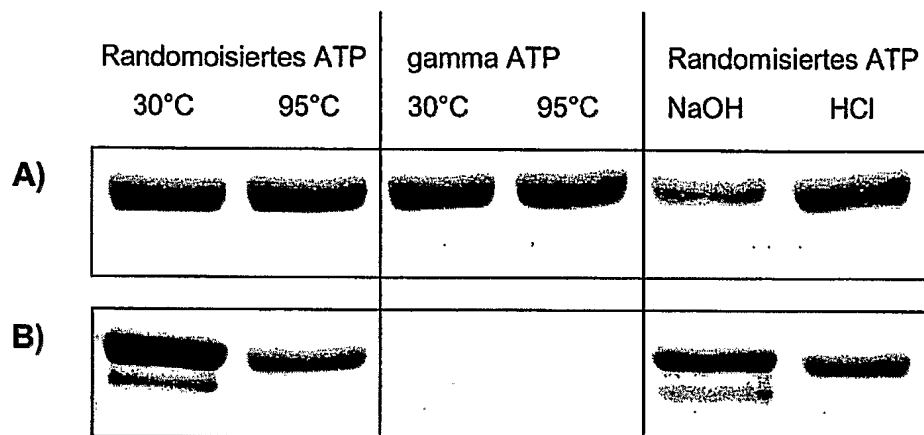


Fig. 5

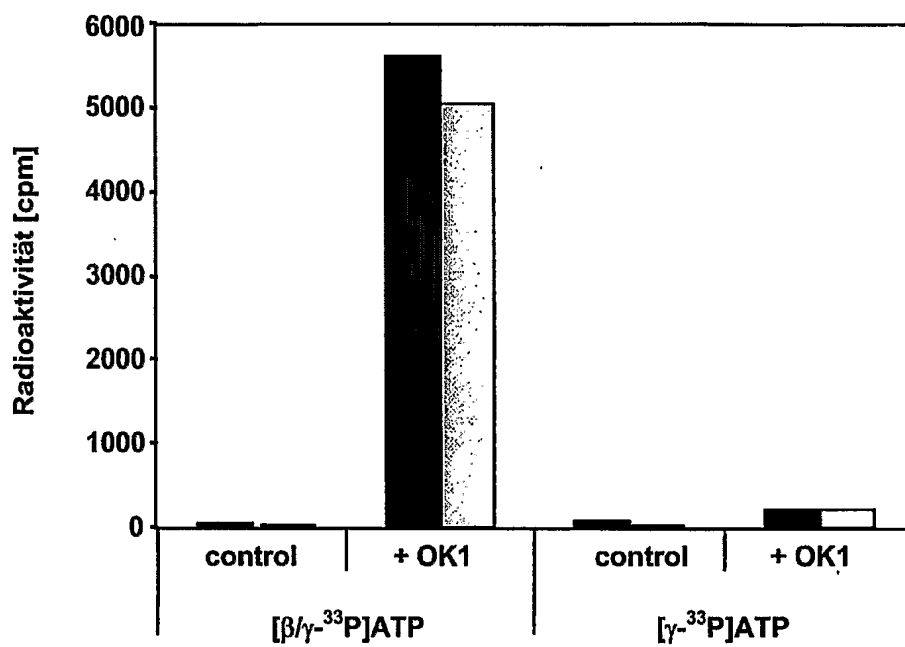


Fig. 6

SEQUENCE LISTING

<110> Bayer CropScience GmbH

<120> Pflanzen mit erhöhter Aktivität mehrerer Stärke phosphorylierender Enzyme

<130> BCS 04-5003-EP

<160> 17

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 3591

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (3591)

<223>

<400> 1

atg gag agc att ggc agc cat tgt tgc agc tct cct ttc acc ttc atc	48
Met Glu Ser Ile Gly Ser His Cys Cys Ser Ser Pro Phe Thr Phe Ile	
1 5 10 15	

act aga aac tca tca tca tca ctt cct aga ctc gtt aac atc act cac	96
Thr Arg Asn Ser Ser Ser Ser Leu Pro Arg Leu Val Asn Ile Thr His	
20 25 30	

aga gtt aat ctc agc cac caa tct cac cga ctc aga aac tcc aat tct	144
Arg Val Asn Leu Ser His Gln Ser His Arg Leu Arg Asn Ser Asn Ser	
35 40 45	

cgt ctc act tgc act gct act tct tct tcc acc att gag gaa caa cgg	192
Arg Leu Thr Cys Thr Ala Thr Ser Ser Ser Thr Ile Glu Glu Gln Arg	
50 55 60	

aag aag aaa gat gga tca gga acg aaa gtg agg ttg aat gtg agg tta	240
Lys Lys Lys Asp Gly Ser Gly Thr Lys Val Arg Leu Asn Val Arg Leu	
65 70 75 80	

gat cat caa gtt aat ttt ggt gac cat gtg gct atg ttt gga tca gct	288
Asp His Gln Val Asn Phe Gly Asp His Val Ala Met Phe Gly Ser Ala	
85 90 95	

aaa gag att ggt tca tgg aaa aag aaa tcg cct ttg aat tgg agt gag	336
Lys Glu Ile Gly Ser Trp Lys Lys Lys Ser Pro Leu Asn Trp Ser Glu	
100 105 110	

aat gga tgg gtt tgt gag ttg gaa ctt gac ggt ggt cag gtt ttg gag	384
Asn Gly Trp Val Cys Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gly Gln Val Leu Glu	
115 120 125	

tat aag ttt gtc att gtt aag aat gat ggt tca ctt tca tgg gaa tct	432
-----------------------------------------------------------------	-----

Tyr	Lys	Phe	Val	Ile	Val	Lys	Asn	Asp	Gly	Ser	Leu	Ser	Trp	Glu	Ser		
130						135					140						
ggg	gat	aat	cgt	gtc	ctt	aag	ggt	cca	aat	tct	ggg	aat	ttt	tct	gtt	480	
Gly	Asp	Asn	Arg	Val	Leu	Lys	Val	Pro	Asn	Ser	Gly	Asn	Phe	Ser	Val		
145					150					155					160		
ggt	tgt	cat	tgg	gat	gct	act	aga	gaa	acc	ctt	gat	ttg	cct	cag	gag	528	
Val	Cys	His	Trp	Asp	Ala	Thr	Arg	Glu	Thr	Leu	Asp	Leu	Pro	Gln	Glu		
				165					170					175			
ggt	ggt	aat	gat	gat	gat	ggt	ggt	gat	ggg	ggg	cat	gag	agg	gat	aat	576	
Val	Gly	Asn	Asp	Asp	Asp	Val	Gly	Asp	Gly	Gly	His	Glu	Arg	Asp	Asn		
			180					185					190				
cat	gat	ggt	ggt	gat	gat	aga	gta	gtg	gga	agt	gaa	aat	ggt	gcg	cag	624	
His	Asp	Val	Gly	Asp	Asp	Arg	Val	Val	Gly	Ser	Glu	Asn	Gly	Ala	Gln		
		195					200					205					
ctt	cag	aag	agt	aca	ttg	ggt	ggg	caa	tgg	caa	ggt	aaa	gat	gcg	tcc	672	
Leu	Gln	Lys	Ser	Thr	Leu	Gly	Gly	Gln	Trp	Gln	Gly	Lys	Asp	Ala	Ser		
	210					215					220						
ttt	atg	cgt	tct	aat	gat	cat	ggt	aac	aga	gaa	gtt	ggt	aga	aat	tgg	720	
Phe	Met	Arg	Ser	Asn	Asp	His	Gly	Asn	Arg	Glu	Val	Gly	Arg	Asn	Trp		
225					230					235					240		
gat	act	agt	ggt	ctt	gaa	ggc	aca	gct	ctt	aag	atg	gtt	gag	ggt	gat	768	
Asp	Thr	Ser	Gly	Leu	Glu	Gly	Thr	Ala	Leu	Lys	Met	Val	Glu	Gly	Asp		
			245					250						255			
cgc	aac	tct	aag	aac	tgg	tgg	aga	aag	ctt	gaa	atg	gta	cgc	gag	gtt	816	
Arg	Asn	Ser	Lys	Asn	Trp	Trp	Arg	Lys	Leu	Glu	Met	Val	Arg	Glu	Val		
			260					265					270				
ata	gtt	ggg	agt	gtt	gag	agg	gag	gaa	cga	ttg	aag	gcg	ctc	ata	tac	864	
Ile	Val	Gly	Ser	Val	Glu	Arg	Glu	Glu	Arg	Leu	Lys	Ala	Leu	Ile	Tyr		
		275					280					285					
tct	gca	att	tat	ttg	aag	tgg	ata	aac	aca	ggt	cag	att	cct	tgt	ttt	912	
Ser	Ala	Ile	Tyr	Leu	Lys	Trp	Ile	Asn	Thr	Gly	Gln	Ile	Pro	Cys	Phe		
	290					295					300						
gaa	gat	gga	ggg	cat	cac	cgt	cca	aac	agg	cat	gcc	gag	att	tcc	aga	960	
Glu	Asp	Gly	Gly	His	His	Arg	Pro	Asn	Arg	His	Ala	Glu	Ile	Ser	Arg		
305				310						315				320			
ctt	ata	ttc	cgt	gag	ttg	gag	cac	att	tgc	agt	aag	aaa	gat	gct	act	1008	
Leu	Ile	Phe	Arg	Glu	Leu	Glu	His	Ile	Cys	Ser	Lys	Lys	Asp	Ala	Thr		
			325					330					335				
cca	gag	gaa	gtg	ctt	gtt	gct	cgg	aaa	atc	cat	ccg	tgt	tta	cct	tct	1056	
Pro	Glu	Glu	Val	Leu	Val	Ala	Arg	Lys	Ile	His	Pro	Cys	Leu	Pro	Ser		
		340					345					350					
ttc	aaa	gca	gag	ttt	act	gca	gct	gtc	cct	cta	act	cgg	att	agg	gac	1104	
Phe	Lys	Ala	Glu	Phe	Thr	Ala	Ala	Val	Pro	Leu	Thr	Arg	Ile	Arg	Asp		

355	360	365	
ata gcc cat cgg aat gat att cct cat gat ctc aag caa gaa atc aag Ile Ala His Arg Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys 370 375 380			1152
cat acg ata caa aat aag ctt cac cgg aat gct ggt cca gaa gat cta His Thr Ile Gln Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu 385 390 395 400			1200
att gca aca gaa gca atg ctt caa cga att acc gag acc cca gga aaa Ile Ala Thr Glu Ala Met Leu Gln Arg Ile Thr Glu Thr Pro Gly Lys 405 410 415			1248
tat agt gga gac ttt gtg gag cag ttt aaa ata ttc cat aat gag ctt Tyr Ser Gly Asp Phe Val Glu Gln Phe Lys Ile Phe His Asn Glu Leu 420 425 430			1296
aaa gat ttc ttt aat gct gga agt ctc act gaa cag ctt gat tct atg Lys Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Thr Glu Gln Leu Asp Ser Met 435 440 445			1344
aaa att tct atg gat gat aga ggt ctt tct gcg ctc aat ttg ttt ttt Lys Ile Ser Met Asp Asp Arg Gly Leu Ser Ala Leu Asn Leu Phe Phe 450 455 460			1392
gaa tgt aaa aag cgc ctt gac aca tca gga gaa tca agc aat gtt ttg Glu Cys Lys Lys Arg Leu Asp Thr Ser Gly Glu Ser Ser Asn Val Leu 465 470 475 480			1440
gag ttg att aaa acc atg cat tct cta gct tct tta aga gaa aca att Glu Leu Ile Lys Thr Met His Ser Leu Ala Ser Leu Arg Glu Thr Ile 485 490 495			1488
ata aag gaa ctt aat agc ggc ttg cga aat gat gct cct gat act gcc Ile Lys Glu Leu Asn Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Pro Asp Thr Ala 500 505 510			1536
att gca atg cgc cag aag tgg cgc ctt tgt gag atc ggc ctc gag gac Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Gly Leu Glu Asp 515 520 525			1584
tac ttt ttt gtt cta cta agc aga ttc ctc aat gct ctt gaa act atg Tyr Phe Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Leu Asn Ala Leu Glu Thr Met 530 535 540			1632
gga gga gct gat caa ctg gca aaa gat gtg gga tca aga aac gtt gcc Gly Gly Ala Asp Gln Leu Ala Lys Asp Val Gly Ser Arg Asn Val Ala 545 550 555 560			1680
tca tgg aat gat cca cta gat gct ttg gtg ttg ggt gtt cac caa gta Ser Trp Asn Asp Pro Leu Asp Ala Leu Val Leu Gly Val His Gln Val 565 570 575			1728
ggt cta tct ggt tgg aag caa gaa gaa tgt tta gcc att gga aat gaa Gly Leu Ser Gly Trp Lys Gln Glu Glu Cys Leu Ala Ile Gly Asn Glu 580 585 590			1776

ctc ctt gct tgg cga gaa agg gac cta ctt gaa aaa gaa ggg gaa gag Leu Leu Ala Trp Arg Glu Arg Asp Leu Leu Glu Lys Glu Gly Glu Glu 595 600 605	1824
gat gga aaa aca att tgg gcc atg agg ctg aaa gca act ctt gat cga Asp Gly Lys Thr Ile Trp Ala Met Arg Leu Lys Ala Thr Leu Asp Arg 610 615 620	1872
gca cgc aga tta aca gca gaa tat tct gat ttg ctt ctt caa ata ttt Ala Arg Arg Leu Thr Ala Glu Tyr Ser Asp Leu Leu Leu Gln Ile Phe 625 630 635 640	1920
cct cct aat gtg gag att tta gga aaa gct cta gga att cca gag aat Pro Pro Asn Val Glu Ile Leu Gly Lys Ala Leu Gly Ile Pro Glu Asn 645 650 655	1968
agt gtc aag acc tat aca gaa gca gag att cgt gct gga att att ttc Ser Val Lys Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala Gly Ile Ile Phe 660 665 670	2016
cag atc tca aag ctc tgc act gtt ctt cta aaa gct gta aga aat tca Gln Ile Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Leu Lys Ala Val Arg Asn Ser 675 680 685	2064
ctt ggt tct gag ggc tgg gat gtc gtt gta cct gga tcg acg tct ggg Leu Gly Ser Glu Gly Trp Asp Val Val Val Pro Gly Ser Thr Ser Gly 690 695 700	2112
aca tta gtt cag gtt gag agc att gtt ccg gga tca ttg cca gca act Thr Leu Val Gln Val Glu Ser Ile Val Pro Gly Ser Leu Pro Ala Thr 705 710 715 720	2160
tct ggt ggt cct att att ctc ttg gtc aat aaa gct gat ggc gat gaa Ser Gly Gly Pro Ile Ile Leu Leu Val Asn Lys Ala Asp Gly Asp Glu 725 730 735	2208
gag gta agt gct gct aat ggg aac ata gct gga gtc atg ctt ctg cag Glu Val Ser Ala Ala Asn Gly Asn Ile Ala Gly Val Met Leu Leu Gln 740 745 750	2256
gag ctg cct cac ttg tct cac ctt ggc gtt aga gcg cgg cag gag aaa Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg Gln Glu Lys 755 760 765	2304
att gtc ttt gtg aca tgt gat gat gat gac aag gtt gct gat ata cga Ile Val Phe Val Thr Cys Asp Asp Asp Asp Lys Val Ala Asp Ile Arg 770 775 780	2352
cga ctt gtg gga aaa ttt gtg agg ttg gaa gca tct cca agt cat gtg Arg Leu Val Gly Lys Phe Val Arg Leu Glu Ala Ser Pro Ser His Val 785 790 795 800	2400
aat ctg ata ctt tca act gag ggt agg agt cgc act tcc aaa tcc agt Asn Leu Ile Leu Ser Thr Glu Gly Arg Ser Arg Thr Ser Lys Ser Ser 805 810 815	2448

gcg acc aaa aaa acg gat aag aac agc tta tct aag aaa aaa aca gat Ala Thr Lys Lys Thr Asp Lys Asn Ser Leu Ser Lys Lys Lys Thr Asp 820 825 830	2496
aag aag agc tta tct atc gat gat gaa gaa tca aag cct ggt tcc tca Lys Lys Ser Leu Ser Ile Asp Asp Glu Glu Ser Lys Pro Gly Ser Ser 835 840 845	2544
tct tcc aat agc ctc ctt tac tct tcc aag gat atc cct agt gga gga Ser Ser Asn Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Lys Asp Ile Pro Ser Gly Gly 850 855 860	2592
atc ata gca ctt gct gat gca gat gta cca act tct ggt tca aaa tct Ile Ile Ala Leu Ala Asp Ala Asp Val Pro Thr Ser Gly Ser Lys Ser 865 870 875 880	2640
gct gca tgt ggt ctt ctt gca tct tta gca gaa gcc tct agt aaa gtg Ala Ala Cys Gly Leu Leu Ala Ser Leu Ala Glu Ala Ser Ser Lys Val 885 890 895	2688
cac agc gaa cac gga gtt ccg gca tca ttt aag gtt cca act gga gtt His Ser Glu His Gly Val Pro Ala Ser Phe Lys Val Pro Thr Gly Val 900 905 910	2736
gtc ata cct ttt gga tcg atg gaa tta gct tta aag caa aat aat tcg Val Ile Pro Phe Gly Ser Met Glu Leu Ala Leu Lys Gln Asn Asn Ser 915 920 925	2784
gaa gaa aag ttt gcg tct ttg cta gaa aaa cta gaa acc gcc aga cct Glu Glu Lys Phe Ala Ser Leu Leu Glu Lys Leu Glu Thr Ala Arg Pro 930 935 940	2832
gag ggt ggt gag cta gac gac ata tgt gac cag atc cat gaa gtg atg Glu Gly Gly Glu Leu Asp Asp Ile Cys Asp Gln Ile His Glu Val Met 945 950 955 960	2880
aaa acg ttg caa gtg cct aaa gaa aca atc aac agc ata agc aaa gcg Lys Thr Leu Gln Val Pro Lys Glu Thr Ile Asn Ser Ile Ser Lys Ala 965 970 975	2928
ttt ctc aaa gat gct cgt ctc att gtt cgt tca agt gct aac gtc gag Phe Leu Lys Asp Ala Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu 980 985 990	2976
gac tta gcc gga atg tca gct gca gga ctc tat gaa tca atc cct aac Asp Leu Ala Gly Met Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Asn 995 1000 1005	3024
gtg agt ccc tcg gat cct ttg gtg ttt tca gat tcg gtt tgc caa Val Ser Pro Ser Asp Pro Leu Val Phe Ser Asp Ser Val Cys Gln 1010 1015 1020	3069
gtt tgg gct tct ctc tac aca aga aga gct gtt cta agc cgt aga Val Trp Ala Ser Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Val Leu Ser Arg Arg 1025 1030 1035	3114
gct gct ggt gtc tct caa aga gaa gct tca atg gct gtt ctc gtt	3159

Ala Ala Gly Val Ser Gln Arg Glu Ala Ser Met Ala Val Leu Val	
1040 1045 1050	
caa gaa atg ctt tcg ccg gac tta tca ttc gtt ctg cac aca gtg	3204
Gln Glu Met Leu Ser Pro Asp Leu Ser Phe Val Leu His Thr Val	
1055 1060 1065	
agt cca gct gat ccg gac agt aac ctt gtg gaa gcc gag atc gct	3249
Ser Pro Ala Asp Pro Asp Ser Asn Leu Val Glu Ala Glu Ile Ala	
1070 1075 1080	
cct ggt tta ggt gag act tta gct tca gga aca aga gga aca cca	3294
Pro Gly Leu Gly Glu Thr Leu Ala Ser Gly Thr Arg Gly Thr Pro	
1085 1090 1095	
tgg aga ctc gct tcg ggt aag ctc gac ggg att gta caa acc tta	3339
Trp Arg Leu Ala Ser Gly Lys Leu Asp Gly Ile Val Gln Thr Leu	
1100 1105 1110	
gct ttc gca aac ttc agc gaa gag ctt ctt gtg tca gga aca ggt	3384
Ala Phe Ala Asn Phe Ser Glu Glu Leu Leu Val Ser Gly Thr Gly	
1115 1120 1125	
cct gct gat gga aaa tac gtt cgg ttg acc gtg gac tat agc aaa	3429
Pro Ala Asp Gly Lys Tyr Val Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Lys	
1130 1135 1140	
aaa cgt tta act gtt gac tcg gtg ttt aga cag cag ctc ggt cag	3474
Lys Arg Leu Thr Val Asp Ser Val Phe Arg Gln Gln Leu Gly Gln	
1145 1150 1155	
aga ctc ggt tcg gtt ggt ttc ttc ttg gaa aga aac ttt ggc tgt	3519
Arg Leu Gly Ser Val Gly Phe Phe Leu Glu Arg Asn Phe Gly Cys	
1160 1165 1170	
gct caa gac gtt gaa ggt tgt ttg gtt ggt gaa gat gtt tac att	3564
Ala Gln Asp Val Glu Gly Cys Leu Val Gly Glu Asp Val Tyr Ile	
1175 1180 1185	
gtt cag tca agg cca caa cct ctg tag	3591
Val Gln Ser Arg Pro Gln Pro Leu	
1190 1195	

<210> 2

<211> 1196

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Glu Ser Ile Gly Ser His Cys Cys Ser Ser Pro Phe Thr Phe Ile
1 5 10 15

Thr Arg Asn Ser Ser Ser Ser Leu Pro Arg Leu Val Asn Ile Thr His
20 25 30

Arg Val Asn Leu Ser His Gln Ser His Arg Leu Arg Asn Ser Asn Ser
35 40 45

Arg Leu Thr Cys Thr Ala Thr Ser Ser Ser Thr Ile Glu Glu Gln Arg
50 55 60

Lys Lys Lys Asp Gly Ser Gly Thr Lys Val Arg Leu Asn Val Arg Leu
65 70 75 80

Asp His Gln Val Asn Phe Gly Asp His Val Ala Met Phe Gly Ser Ala
85 90 95

Lys Glu Ile Gly Ser Trp Lys Lys Lys Ser Pro Leu Asn Trp Ser Glu
100 105 110

Asn Gly Trp Val Cys Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gly Gln Val Leu Glu
115 120 125

Tyr Lys Phe Val Ile Val Lys Asn Asp Gly Ser Leu Ser Trp Glu Ser
130 135 140

Gly Asp Asn Arg Val Leu Lys Val Pro Asn Ser Gly Asn Phe Ser Val
145 150 155 160

Val Cys His Trp Asp Ala Thr Arg Glu Thr Leu Asp Leu Pro Gln Glu
165 170 175

Val Gly Asn Asp Asp Asp Val Gly Asp Gly Gly His Glu Arg Asp Asn
180 185 190

His Asp Val Gly Asp Asp Arg Val Val Gly Ser Glu Asn Gly Ala Gln
195 200 205

Leu Gln Lys Ser Thr Leu Gly Gly Gln Trp Gln Gly Lys Asp Ala Ser
210 215 220

Phe Met Arg Ser Asn Asp His Gly Asn Arg Glu Val Gly Arg Asn Trp
225 230 235 240

Asp Thr Ser Gly Leu Glu Gly Thr Ala Leu Lys Met Val Glu Gly Asp
245 250 255

Arg Asn Ser Lys Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Met Val Arg Glu Val
260 265 270

Ile Val Gly Ser Val Glu Arg Glu Glu Arg Leu Lys Ala Leu Ile Tyr
275 280 285

Ser Ala Ile Tyr Leu Lys Trp Ile Asn Thr Gly Gln Ile Pro Cys Phe
290 295 300

Glu Asp Gly Gly His His Arg Pro Asn Arg His Ala Glu Ile Ser Arg
305 310 315 320

Leu Ile Phe Arg Glu Leu Glu His Ile Cys Ser Lys Lys Asp Ala Thr
325 330 335

Pro Glu Glu Val Leu Val Ala Arg Lys Ile His Pro Cys Leu Pro Ser
340 345 350

Phe Lys Ala Glu Phe Thr Ala Ala Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp
355 360 365

Ile Ala His Arg Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys
370 375 380

His Thr Ile Gln Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu
385 390 395 400

Ile Ala Thr Glu Ala Met Leu Gln Arg Ile Thr Glu Thr Pro Gly Lys
405 410 415

Tyr Ser Gly Asp Phe Val Glu Gln Phe Lys Ile Phe His Asn Glu Leu
420 425 430

Lys Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Thr Glu Gln Leu Asp Ser Met
435 440 445

Lys Ile Ser Met Asp Asp Arg Gly Leu Ser Ala Leu Asn Leu Phe Phe
450 455 460

Glu Cys Lys Lys Arg Leu Asp Thr Ser Gly Glu Ser Ser Asn Val Leu
465 470 475 480

Glu Leu Ile Lys Thr Met His Ser Leu Ala Ser Leu Arg Glu Thr Ile
485 490 495

Ile Lys Glu Leu Asn Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Pro Asp Thr Ala
500 505 510

Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Gly Leu Glu Asp
515 520 525

Tyr Phe Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Leu Asn Ala Leu Glu Thr Met
530 535 540

Gly Gly Ala Asp Gln Leu Ala Lys Asp Val Gly Ser Arg Asn Val Ala
545 550 555 560

Ser Trp Asn Asp Pro Leu Asp Ala Leu Val Leu Gly Val His Gln Val
565 570 575

Gly Leu Ser Gly Trp Lys Gln Glu Glu Cys Leu Ala Ile Gly Asn Glu
580 585 590

Leu Leu Ala Trp Arg Glu Arg Asp Leu Leu Glu Lys Glu Gly Glu Glu
595 600 605

Asp Gly Lys Thr Ile Trp Ala Met Arg Leu Lys Ala Thr Leu Asp Arg
610 615 620

Ala Arg Arg Leu Thr Ala Glu Tyr Ser Asp Leu Leu Leu Gln Ile Phe
625 630 635 640

Pro Pro Asn Val Glu Ile Leu Gly Lys Ala Leu Gly Ile Pro Glu Asn
645 650 655

Ser Val Lys Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala Gly Ile Ile Phe
660 665 670

Gln Ile Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Leu Lys Ala Val Arg Asn Ser
675 680 685

Leu Gly Ser Glu Gly Trp Asp Val Val Val Pro Gly Ser Thr Ser Gly
690 695 700

Thr Leu Val Gln Val Glu Ser Ile Val Pro Gly Ser Leu Pro Ala Thr

705	710	715	720
Ser Gly Gly Pro Ile Ile Leu Leu Val Asn Lys Ala Asp Gly Asp Glu	725	730	735
Glu Val Ser Ala Ala Asn Gly Asn Ile Ala Gly Val Met Leu Leu Gln	740	745	750
Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg Gln Glu Lys	755	760	765
Ile Val Phe Val Thr Cys Asp Asp Asp Asp Lys Val Ala Asp Ile Arg	770	775	780
Arg Leu Val Gly Lys Phe Val Arg Leu Glu Ala Ser Pro Ser His Val	785	790	795
Asn Leu Ile Leu Ser Thr Glu Gly Arg Ser Arg Thr Ser Lys Ser Ser	805	810	815
Ala Thr Lys Lys Thr Asp Lys Asn Ser Leu Ser Lys Lys Lys Thr Asp	820	825	830
Lys Lys Ser Leu Ser Ile Asp Asp Glu Glu Ser Lys Pro Gly Ser Ser	835	840	845
Ser Ser Asn Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Lys Asp Ile Pro Ser Gly Gly	850	855	860
Ile Ile Ala Leu Ala Asp Ala Asp Val Pro Thr Ser Gly Ser Lys Ser	865	870	875
Ala Ala Cys Gly Leu Leu Ala Ser Leu Ala Glu Ala Ser Ser Lys Val	885	890	895
His Ser Glu His Gly Val Pro Ala Ser Phe Lys Val Pro Thr Gly Val	900	905	910
Val Ile Pro Phe Gly Ser Met Glu Leu Ala Leu Lys Gln Asn Asn Ser	915	920	925
Glu Glu Lys Phe Ala Ser Leu Leu Glu Lys Leu Glu Thr Ala Arg Pro	930	935	940

Glu Gly Gly Glu Leu Asp Asp Ile Cys Asp Gln Ile His Glu Val Met
 945 950 955 960

Lys Thr Leu Gln Val Pro Lys Glu Thr Ile Asn Ser Ile Ser Lys Ala
 965 970 975

Phe Leu Lys Asp Ala Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu
 980 985 990

Asp Leu Ala Gly Met Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Asn
 995 1000 1005

Val Ser Pro Ser Asp Pro Leu Val Phe Ser Asp Ser Val Cys Gln
 1010 1015 1020

Val Trp Ala Ser Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Val Leu Ser Arg Arg
 1025 1030 1035

Ala Ala Gly Val Ser Gln Arg Glu Ala Ser Met Ala Val Leu Val
 1040 1045 1050

Gln Glu Met Leu Ser Pro Asp Leu Ser Phe Val Leu His Thr Val
 1055 1060 1065

Ser Pro Ala Asp Pro Asp Ser Asn Leu Val Glu Ala Glu Ile Ala
 1070 1075 1080

Pro Gly Leu Gly Glu Thr Leu Ala Ser Gly Thr Arg Gly Thr Pro
 1085 1090 1095

Trp Arg Leu Ala Ser Gly Lys Leu Asp Gly Ile Val Gln Thr Leu
 1100 1105 1110

Ala Phe Ala Asn Phe Ser Glu Glu Leu Leu Val Ser Gly Thr Gly
 1115 1120 1125

Pro Ala Asp Gly Lys Tyr Val Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Lys
 1130 1135 1140

Lys Arg Leu Thr Val Asp Ser Val Phe Arg Gln Gln Leu Gly Gln
 1145 1150 1155

Arg Leu Gly Ser Val Gly Phe Phe Leu Glu Arg Asn Phe Gly Cys
 1160 1165 1170

Ala Gln Asp Val Glu Gly Cys Leu Val Gly Glu Asp Val Tyr Ile
 1175 1180 1185

Val Gln Ser Arg Pro Gln Pro Leu
 1190 1195

<210> 3
 <211> 3644
 <212> DNA
 <213> Oryza sativa

<220>
 <221> CDS
 <222> (13)..(3633)
 <223>

<400> 3
 cgaggaggat ca atg acg tcg ctg cgg ccc ctc gaa acc tcg ctc tcc ata 51
 Met Thr Ser Leu Arg Pro Leu Glu Thr Ser Leu Ser Ile
 1 5 10

ggc ggc agg ccg cgc cgt ggt ctc gtc ctc ccg ccg ccc gga gtc ggt 99
 Gly Gly Arg Pro Arg Arg Gly Leu Val Leu Pro Pro Pro Gly Val Gly
 15 20 25

gcg ggt gtg ctg ctc cgc cgg gga gcg atg gcg ctc cct ggg cgg cgc 147
 Ala Gly Val Leu Leu Arg Arg Gly Ala Met Ala Leu Pro Gly Arg Arg
 30 35 40 45

ggc ttc gcg tgc cgc ggg aga tcc gcg gcc tcg gcg gca gag aga aca 195
 Gly Phe Ala Cys Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Ala Ala Glu Arg Thr
 50 55 60

aag gag aaa aag aga aga gat tct tca aag cag cca ttg gtg cat ctc 243
 Lys Glu Lys Lys Arg Arg Asp Ser Ser Lys Gln Pro Leu Val His Leu
 65 70 75

cag gtt tgt cta gag cac cag gtt aag ttt ggt gag cat gta ggc att 291
 Gln Val Cys Leu Glu His Gln Val Lys Phe Gly Glu His Val Gly Ile
 80 85 90

atc ggt tcc aca aag gag ctt ggt tca tgg gag gag cag gtt gaa ctg 339
 Ile Gly Ser Thr Lys Glu Leu Gly Ser Trp Glu Glu Gln Val Glu Leu
 95 100 105

gaa tgg act aca aat ggt tgg gtc tgc cag ctt aag ctc cct gga gaa 387
 Glu Trp Thr Thr Asn Gly Trp Val Cys Gln Leu Lys Leu Pro Gly Glu
 110 115 120 125

aca ctt gtg gag ttt aaa ttt gtt ata ttt ttg gtg gga gga aaa gat Thr Leu Val Glu Phe Lys Phe Val Ile Phe Leu Val Gly Gly Lys Asp 130 135 140	435
aaa ata tgg gaa gat ggt aat aac cgt gtt gtt gag ctg ccg aag gat Lys Ile Trp Glu Asp Gly Asn Asn Arg Val Val Glu Leu Pro Lys Asp 145 150 155	483
ggt aag ttt gat ata gta tgc cac tgg aat aga aca gaa gag cca tta Gly Lys Phe Asp Ile Val Cys His Trp Asn Arg Thr Glu Glu Pro Leu 160 165 170	531
gaa ctt tta gga aca cca aag ttt gag ttg gtc gga gaa gct gaa aag Glu Leu Leu Gly Thr Pro Lys Phe Glu Leu Val Gly Glu Ala Glu Lys 175 180 185	579
aat act ggc gag gat gct tca gca tct gta act ttt gca cct gaa aaa Asn Thr Gly Glu Asp Ala Ser Ala Ser Val Thr Phe Ala Pro Glu Lys 190 195 200 205	627
gtt caa gat att tca gtt gtt gag aat ggt gat cca gca cca gag gcc Val Gln Asp Ile Ser Val Val Glu Asn Gly Asp Pro Ala Pro Glu Ala 210 215 220	675
gag tca agc aaa ttt ggt ggg caa tgg caa gga agt aaa act gtt ttc Glu Ser Ser Lys Phe Gly Gly Gln Trp Gln Gly Ser Lys Thr Val Phe 225 230 235	723
atg aga tca aat gag cat ctg aat aag gag gct gat agg atg tgg gat Met Arg Ser Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Ala Asp Arg Met Trp Asp 240 245 250	771
aca act ggg ctt gat gga ata gca ctg aaa ctg gtg gag ggc gat aaa Thr Thr Gly Leu Asp Gly Ile Ala Leu Lys Leu Val Glu Gly Asp Lys 255 260 265	819
gca tcc agg aac tgg tgg cgg aag tta gag gtt gtt cgc ggg ata ttg Ala Ser Arg Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Val Val Arg Gly Ile Leu 270 275 280 285	867
tca gaa tct ttt gat gac cag agt cgt ctg ggg gcc ctt gta tac tca Ser Glu Ser Phe Asp Asp Gln Ser Arg Leu Gly Ala Leu Val Tyr Ser 290 295 300	915
gct att tat ctg aag tgg att tat aca ggt cag ata tcg tgc ttt gaa Ala Ile Tyr Leu Lys Trp Ile Tyr Thr Gly Gln Ile Ser Cys Phe Glu 305 310 315	963
gat ggt ggc cac cat cgg cct aac aaa cat gct gag ata tcg agg caa Asp Gly Gly His His Arg Pro Asn Lys His Ala Glu Ile Ser Arg Gln 320 325 330	1011
ata ttc cgt gaa ctt gaa atg atg tat tat ggg aaa acc aca tca gcc Ile Phe Arg Glu Leu Glu Met Met Tyr Tyr Gly Lys Thr Thr Ser Ala 335 340 345	1059
aag gat gtt ctc gtg att cgc aaa att cat ccc ttt ttg cct tca ttt	1107

Lys Asp Val Leu Val Ile Arg Lys Ile His Pro Phe Leu Pro Ser Phe 350 355 360 365	
aag tca gag ttt aca gcc tct gtc cct cta aca cga att cgt gat att Lys Ser Glu Phe Thr Ala Ser Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp Ile 370 375 380	1155
gct cac cgg aat gac atc cca cat gat ctc aag caa gaa atc aag cat Ala His Arg Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys His 385 390 395	1203
act ata caa aac aaa ctt cat cgt aat gct gga cct gag gat ctt att Thr Ile Gln Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu Ile 400 405 410	1251
gct aca gaa gtc atg ctt gct agg att act aag acc cct gga gaa tac Ala Thr Glu Val Met Leu Ala Arg Ile Thr Lys Thr Pro Gly Glu Tyr 415 420 425	1299
agt gaa aca ttt gtt gaa caa ttc acg ata ttt tat agc gaa cta aaa Ser Glu Thr Phe Val Glu Gln Phe Thr Ile Phe Tyr Ser Glu Leu Lys 430 435 440 445	1347
gat ttc ttc aat gct ggc agc cta ttt gag caa ctg gag tcc atc aag Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Phe Glu Gln Leu Glu Ser Ile Lys 450 455 460	1395
gaa tct ctg aac gag tca ggc tta gaa gtt ctc tca tcc ttt gtg gaa Glu Ser Leu Asn Glu Ser Gly Leu Glu Val Leu Ser Ser Phe Val Glu 465 470 475	1443
acc aaa agg agt ttg gac caa gtg gat cat gca gaa gat ttg gat aaa Thr Lys Arg Ser Leu Asp Gln Val Asp His Ala Glu Asp Leu Asp Lys 480 485 490	1491
aat gat acc att caa att ttg atg act acc ttg caa tca tta tct tct Asn Asp Thr Ile Gln Ile Leu Met Thr Thr Leu Gln Ser Leu Ser Ser 495 500 505	1539
cta aga tcg gtt cta atg aag ggc ctt gaa agt ggc ctt aga aat gat Leu Arg Ser Val Leu Met Lys Gly Leu Glu Ser Gly Leu Arg Asn Asp 510 515 520 525	1587
gcg cct gat aat gct ata gca atg cga caa aag tgg cgc ctt tgt gaa Ala Pro Asp Asn Ala Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu 530 535 540	1635
att agt ctt gag gat tat tca ttt gtt ctg tta agc aga ttc atc aat Ile Ser Leu Glu Asp Tyr Ser Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Ile Asn 545 550 555	1683
act ctt gaa gcc tta ggt gga tca gct tca ctt gca aag gat gta gct Thr Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Lys Asp Val Ala 560 565 570	1731
aga aat act act cta tgg gat act act ctt gat gcc ctt gtc att ggc Arg Asn Thr Thr Leu Trp Asp Thr Thr Leu Asp Ala Leu Val Ile Gly 1779	

575	580	585	
atc aat caa gtt agc ttt tca ggt tgg aaa aca gat gaa tgt att gcc Ile Asn Gln Val Ser Phe Ser Gly Trp Lys Thr Asp Glu Cys Ile Ala 590 595 600 605			1827
ata ggg aat gag att ctt tcc tgg aag caa aaa ggt cta tct gaa agt Ile Gly Asn Glu Ile Leu Ser Trp Lys Gln Lys Gly Leu Ser Glu Ser 610 615 620			1875
gaa ggt tgt gaa gat ggg aaa tat att tgg tca cta aga ctt aaa gct Glu Gly Cys Glu Asp Gly Lys Tyr Ile Trp Ser Leu Arg Leu Lys Ala 625 630 635			1923
aca ctg gac aga gca cgg aga tta acg gaa gag tac tct gaa gca ctt Thr Leu Asp Arg Ala Arg Arg Leu Thr Glu Glu Tyr Ser Glu Ala Leu 640 645 650			1971
ctt tct ata ttc cct gaa aaa gta atg gtt att ggg aaa gcc ctt gga Leu Ser Ile Phe Pro Glu Lys Val Met Val Ile Gly Lys Ala Leu Gly 655 660 665			2019
ata cca gat aac agt gtg aga act tac aca gag gca gaa att cgt gct Ile Pro Asp Asn Ser Val Arg Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala 670 675 680 685			2067
ggc att gtt ttt cag gta tct aaa cta tgc aca gta ctt cag aaa gca Gly Ile Val Phe Gln Val Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Gln Lys Ala 690 695 700			2115
att cga gaa gta ctt gga tca act ggc tgg gat gtt ctt gtt cct gga Ile Arg Glu Val Leu Gly Ser Thr Gly Trp Asp Val Leu Val Pro Gly 705 710 715			2163
gtg gcc cat gga act ctg atg cgg gtg gaa aga att ctt cct gga tca Val Ala His Gly Thr Leu Met Arg Val Glu Arg Ile Leu Pro Gly Ser 720 725 730			2211
tta cct tca tct gtc aaa gaa cct gtg gtt cta att gta gat aag gct Leu Pro Ser Ser Val Lys Glu Pro Val Val Leu Ile Val Asp Lys Ala 735 740 745			2259
gat gga gat gaa gag gtc aaa gct gct ggg gat aat ata gtt ggt gtt Asp Gly Asp Glu Glu Val Lys Ala Ala Gly Asp Asn Ile Val Gly Val 750 755 760 765			2307
att ctt ctt cag gaa cta cct cac ctt tca cat ctt ggt gtt aga gct Ile Leu Leu Gln Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala 770 775 780			2355
cgt caa gag aat gtt gta ttt gta act tgt gaa tat gat gac aca gtt Arg Gln Glu Asn Val Val Phe Val Thr Cys Glu Tyr Asp Asp Thr Val 785 790 795			2403
aca gat gtg tat ttg ctt gag gga aaa tat atc aga tta gaa gca tca Thr Asp Val Tyr Leu Leu Glu Gly Lys Tyr Ile Arg Leu Glu Ala Ser 800 805 810			2451

tcc atc aat gtc aat ctc tca ata gtt tca gaa aaa aat gac aat gct Ser Ile Asn Val Asn Leu Ser Ile Val Ser Glu Lys Asn Asp Asn Ala 815 820 825	2499
gtc tct aca gaa cca aat agt aca ggg aat cca ttt caa cag aaa ctc Val Ser Thr Glu Pro Asn Ser Thr Gly Asn Pro Phe Gln Gln Lys Leu 830 835 840 845	2547
caa aat gaa ttc tct cta cca tcg gat atc gag atg cca ctg caa atg Gln Asn Glu Phe Ser Leu Pro Ser Asp Ile Glu Met Pro Leu Gln Met 850 855 860	2595
tct aag caa aaa agc aaa tca gga gtg aat ggt agt ttt gct gct ctt Ser Lys Gln Lys Ser Lys Ser Gly Val Asn Gly Ser Phe Ala Ala Leu 865 870 875	2643
gag ctt tca gaa gct tca gtg gaa tca gct ggt gca aaa gct gct gca Glu Leu Ser Glu Ala Ser Val Glu Ser Ala Gly Ala Lys Ala Ala Ala 880 885 890	2691
tgc aga act ctt tct gtt ctt gct tca ttg tct aat aaa gtc tat agt Cys Arg Thr Leu Ser Val Leu Ala Ser Leu Ser Asn Lys Val Tyr Ser 895 900 905	2739
gat caa gga gtt cca gca gcc ttt aga gtc cct tct ggt gct gtg ata Asp Gln Gly Val Pro Ala Ala Phe Arg Val Pro Ser Gly Ala Val Ile 910 915 920 925	2787
cca ttt gga tca atg gag gat gcg ctc aag aaa agt gga tca ctg gaa Pro Phe Gly Ser Met Glu Asp Ala Leu Lys Lys Ser Gly Ser Leu Glu 930 935 940	2835
tcc ttt aca agc ctt cta gaa aag att gaa aca gcc aaa gtc gaa aat Ser Phe Thr Ser Leu Leu Glu Lys Ile Glu Thr Ala Lys Val Glu Asn 945 950 955	2883
ggt gaa gtt gat agc ctg gcg ttg gag cta caa gca ata att tca cat Gly Glu Val Asp Ser Leu Ala Leu Glu Leu Gln Ala Ile Ile Ser His 960 965 970	2931
ctt tcc cca ccg gag gag act att ata ttt ctc aaa aga atc ttc cca Leu Ser Pro Pro Glu Glu Thr Ile Ile Phe Leu Lys Arg Ile Phe Pro 975 980 985	2979
cag gat gtc cgg ttg att gtt aga tct agt gct aat gtg gag gat ttg Gln Asp Val Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu Asp Leu 990 995 1000 1005	3027
gct ggt atg tca gct gct ggt ctc tat gat tca att ccc aat gtc Ala Gly Met Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Ile Pro Asn Val 1010 1015 1020	3072
agt ctc atg gac cca tgt gcc ttt gga gct gcg gtt ggg aag gtt Ser Leu Met Asp Pro Cys Ala Phe Gly Ala Ala Val Gly Lys Val 1025 1030 1035	3117

tgg gct tct tta tac	aca agg aga gcc atc	cta agc cgt cga gcc	3162
Trp Ala Ser Leu Tyr	Thr Arg Arg Ala Ile	Leu Ser Arg Arg Ala	
1040	1045	1050	
gct ggt gtt tat cag	aga gac gcg aca atg	gct gtt ctt gtc caa	3207
Ala Gly Val Tyr Gln	Arg Asp Ala Thr Met	Ala Val Leu Val Gln	
1055	1060	1065	
gaa ata ctg cag cca	gat ctc tcc ttc gtg	ctt cat act gtt tgc	3252
Glu Ile Leu Gln Pro	Asp Leu Ser Phe Val	Leu His Thr Val Cys	
1070	1075	1080	
ccc gct gac cat gac	ccc aag gtt gtc cag	gct gag gtc gcc cct	3297
Pro Ala Asp His Asp	Pro Lys Val Val Gln	Ala Glu Val Ala Pro	
1085	1090	1095	
ggg ctg ggt gaa acg	ctt gct tca gga acc	cgt ggc acc ccg tgg	3342
Gly Leu Gly Glu Thr	Leu Ala Ser Gly Thr	Arg Gly Thr Pro Trp	
1100	1105	1110	
agg ctg tca tgt aac	aaa ttc gat gga aaa	gtt gcc act ctt gcc	3387
Arg Leu Ser Cys Asn	Lys Phe Asp Gly Lys	Val Ala Thr Leu Ala	
1115	1120	1125	
ttt tca aat ttc agt	gag gag atg gtg gtg	cac aac tct ggt cct	3432
Phe Ser Asn Phe Ser	Glu Glu Met Val Val	His Asn Ser Gly Pro	
1130	1135	1140	
gcc aat gga gaa gta	att cgt ctt act gtt	gat tac agc aag aag	3477
Ala Asn Gly Glu Val	Ile Arg Leu Thr Val	Asp Tyr Ser Lys Lys	
1145	1150	1155	
cca ttg tcg gtt gat	aca acc ttt agg aag	cag ttt ggt cag cga	3522
Pro Leu Ser Val Asp	Thr Thr Phe Arg Lys	Gln Phe Gly Gln Arg	
1160	1165	1170	
ctg gct gcg att ggc	cag tat ctg gag cag	aag ttc ggg agt gca	3567
Leu Ala Ala Ile Gly	Gln Tyr Leu Glu Gln	Lys Phe Gly Ser Ala	
1175	1180	1185	
cag gat gtg gaa ggt	tgc ctg gtt ggg aaa	gat att ttt ata gtg	3612
Gln Asp Val Glu Gly	Cys Leu Val Gly Lys	Asp Ile Phe Ile Val	
1190	1195	1200	
caa agc agg cca cag	cca tag aagccgaatt c		3644
Gln Ser Arg Pro Gln	Pro		
1205			

<210> 4
 <211> 1206
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa

<400> 4

Met Thr Ser Leu Arg Pro Leu Glu Thr Ser Leu Ser Ile Gly Gly Arg

1	5	10	15
Pro Arg Arg Gly Leu Val Leu Pro Pro Pro Gly Val Gly Ala Gly Val	20	25	30
Leu Leu Arg Arg Gly Ala Met Ala Leu Pro Gly Arg Arg Gly Phe Ala	35	40	45
Cys Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Ala Ala Glu Arg Thr Lys Glu Lys	50	55	60
Lys Arg Arg Asp Ser Ser Lys Gln Pro Leu Val His Leu Gln Val Cys	65	70	75
Leu Glu His Gln Val Lys Phe Gly Glu His Val Gly Ile Ile Gly Ser	85	90	95
Thr Lys Glu Leu Gly Ser Trp Glu Glu Gln Val Glu Leu Glu Trp Thr	100	105	110
Thr Asn Gly Trp Val Cys Gln Leu Lys Leu Pro Gly Glu Thr Leu Val	115	120	125
Glu Phe Lys Phe Val Ile Phe Leu Val Gly Gly Lys Asp Lys Ile Trp	130	135	140
Glu Asp Gly Asn Asn Arg Val Val Glu Leu Pro Lys Asp Gly Lys Phe	145	150	155
Asp Ile Val Cys His Trp Asn Arg Thr Glu Glu Pro Leu Glu Leu Leu	165	170	175
Gly Thr Pro Lys Phe Glu Leu Val Gly Glu Ala Glu Lys Asn Thr Gly	180	185	190
Glu Asp Ala Ser Ala Ser Val Thr Phe Ala Pro Glu Lys Val Gln Asp	195	200	205
Ile Ser Val Val Glu Asn Gly Asp Pro Ala Pro Glu Ala Glu Ser Ser	210	215	220
Lys Phe Gly Gly Gln Trp Gln Gly Ser Lys Thr Val Phe Met Arg Ser	225	230	235
			240

Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Ala Asp Arg Met Trp Asp Thr Thr Gly
245 250 255

Leu Asp Gly Ile Ala Leu Lys Leu Val Glu Gly Asp Lys Ala Ser Arg
260 265 270

Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Val Val Arg Gly Ile Leu Ser Glu Ser
275 280 285

Phe Asp Asp Gln Ser Arg Leu Gly Ala Leu Val Tyr Ser Ala Ile Tyr
290 295 300

Leu Lys Trp Ile Tyr Thr Gly Gln Ile Ser Cys Phe Glu Asp Gly Gly
305 310 315 320

His His Arg Pro Asn Lys His Ala Glu Ile Ser Arg Gln Ile Phe Arg
325 330 335

Glu Leu Glu Met Met Tyr Tyr Gly Lys Thr Thr Ser Ala Lys Asp Val
340 345 350

Leu Val Ile Arg Lys Ile His Pro Phe Leu Pro Ser Phe Lys Ser Glu
355 360 365

Phe Thr Ala Ser Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp Ile Ala His Arg
370 375 380

Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys His Thr Ile Gln
385 390 395 400

Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu Ile Ala Thr Glu
405 410 415

Val Met Leu Ala Arg Ile Thr Lys Thr Pro Gly Glu Tyr Ser Glu Thr
420 425 430

Phe Val Glu Gln Phe Thr Ile Phe Tyr Ser Glu Leu Lys Asp Phe Phe
435 440 445

Asn Ala Gly Ser Leu Phe Glu Gln Leu Glu Ser Ile Lys Glu Ser Leu
450 455 460

Asn Glu Ser Gly Leu Glu Val Leu Ser Ser Phe Val Glu Thr Lys Arg
465 470 475 480

Ser Leu Asp Gln Val Asp His Ala Glu Asp Leu Asp Lys Asn Asp Thr
485 490 495

Ile Gln Ile Leu Met Thr Thr Leu Gln Ser Leu Ser Ser Leu Arg Ser
500 505 510

Val Leu Met Lys Gly Leu Glu Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Pro Asp
515 520 525

Asn Ala Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Ser Leu
530 535 540

Glu Asp Tyr Ser Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Ile Asn Thr Leu Glu
545 550 555 560

Ala Leu Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Lys Asp Val Ala Arg Asn Thr
565 570 575

Thr Leu Trp Asp Thr Thr Leu Asp Ala Leu Val Ile Gly Ile Asn Gln
580 585 590

Val Ser Phe Ser Gly Trp Lys Thr Asp Glu Cys Ile Ala Ile Gly Asn
595 600 605

Glu Ile Leu Ser Trp Lys Gln Lys Gly Leu Ser Glu Ser Glu Gly Cys
610 615 620

Glu Asp Gly Lys Tyr Ile Trp Ser Leu Arg Leu Lys Ala Thr Leu Asp
625 630 635 640

Arg Ala Arg Arg Leu Thr Glu Glu Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Ser Ile
645 650 655

Phe Pro Glu Lys Val Met Val Ile Gly Lys Ala Leu Gly Ile Pro Asp
660 665 670

Asn Ser Val Arg Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala Gly Ile Val
675 680 685

Phe Gln Val Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Gln Lys Ala Ile Arg Glu
690 695 700

Val Leu Gly Ser Thr Gly Trp Asp Val Leu Val Pro Gly Val Ala His
705 710 715 720

Gly Thr Leu Met Arg Val Glu Arg Ile Leu Pro Gly Ser Leu Pro Ser
725 730 735

Ser Val Lys Glu Pro Val Val Leu Ile Val Asp Lys Ala Asp Gly Asp
740 745 750

Glu Glu Val Lys Ala Ala Gly Asp Asn Ile Val Gly Val Ile Leu Leu
755 760 765

Gln Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg Gln Glu
770 775 780

Asn Val Val Phe Val Thr Cys Glu Tyr Asp Asp Thr Val Thr Asp Val
785 790 795 800

Tyr Leu Leu Glu Gly Lys Tyr Ile Arg Leu Glu Ala Ser Ser Ile Asn
805 810 815

Val Asn Leu Ser Ile Val Ser Glu Lys Asn Asp Asn Ala Val Ser Thr
820 825 830

Glu Pro Asn Ser Thr Gly Asn Pro Phe Gln Gln Lys Leu Gln Asn Glu
835 840 845

Phe Ser Leu Pro Ser Asp Ile Glu Met Pro Leu Gln Met Ser Lys Gln
850 855 860

Lys Ser Lys Ser Gly Val Asn Gly Ser Phe Ala Ala Leu Glu Leu Ser
865 870 875 880

Glu Ala Ser Val Glu Ser Ala Gly Ala Lys Ala Ala Ala Cys Arg Thr
885 890 895

Leu Ser Val Leu Ala Ser Leu Ser Asn Lys Val Tyr Ser Asp Gln Gly
900 905 910

Val Pro Ala Ala Phe Arg Val Pro Ser Gly Ala Val Ile Pro Phe Gly

Glu Val Ile Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Lys Lys Pro Leu Ser
1145 1150 1155

Val Asp Thr Thr Phe Arg Lys Gln Phe Gly Gln Arg Leu Ala Ala
1160 1165 1170

Ile Gly Gln Tyr Leu Glu Gln Lys Phe Gly Ser Ala Gln Asp Val
1175 1180 1185

Glu Gly Cys Leu Val Gly Lys Asp Ile Phe Ile Val Gln Ser Arg
1190 1195 1200

Pro Gln Pro
1205

<210> 5
<211> 12
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana, Oryza sativa

<400> 5

Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg
1 5 10

<210> 6
<211> 5124
<212> DNA
<213> Citrus reticulata

<220>
<221> CDS
<222> (257) .. (4684)
<223>

<300>
<308> EMBL / AY094062
<309> 2003-05-03

<400> 6
gcacgagctc ttattacaag gtgccacgcg tcgtccgcga ctgagataaa tcgcaagtgt 60
cgctccagat tttagtactt gtttcttacg gactccgtga aaaaaaccaa aatcaaataa 120
tagcgaatag ccatagtcac attctcagct tcacatcaatat ctctaccaag cagtatctct 180
tcgtatattc accatccact tatcgtttca tgctccaatt actctgagct aagaagtgtgta 240

cttattgtag aggaat atg agc aat agc ata ggc cgt aat gta ctc cac cag	292
Met Ser Asn Ser Ile Gly Arg Asn Val Leu His Gln	
1 5 10	
agc ttg ctt tgt tca acg gtt ttt gag cat caa agc aac cgt cat tct	340
Ser Leu Leu Cys Ser Thr Val Phe Glu His Gln Ser Asn Arg His Ser	
15 20 25	
tct ggc att cct gca aac tct ttg ttt caa gct gtc tct ata aat caa	388
Ser Gly Ile Pro Ala Asn Ser Leu Phe Gln Ala Val Ser Ile Asn Gln	
30 35 40	
ccg gcg ggg gcg tcg gca gca cgc aag tcg cct tta tct acc aaa ttt	436
Pro Ala Gly Ala Ser Ala Ala Arg Lys Ser Pro Leu Ser Thr Lys Phe	
45 50 55 60	
tac ggg acg agt ttg aat gct aga cca aag atg gcc atg gga agg cat	484
Tyr Gly Thr Ser Leu Asn Ala Arg Pro Lys Met Ala Met Gly Arg His	
65 70 75	
cgc cct gtt ttg atc act cca cgt gct gta tta gcc gtg gat tca gct	532
Arg Pro Val Leu Ile Thr Pro Arg Ala Val Leu Ala Val Asp Ser Ala	
80 85 90	
tct gag ctt gca gga aaa ttc aac ctt gaa ggg aat gtt gaa ttg cag	580
Ser Glu Leu Ala Gly Lys Phe Asn Leu Glu Gly Asn Val Glu Leu Gln	
95 100 105	
att aca gtt ggt gct cca act cca ggg tct ttg aca caa gta aat att	628
Ile Thr Val Gly Ala Pro Thr Pro Gly Ser Leu Thr Gln Val Asn Ile	
110 115 120	
gag atc tca tat agt agc aat tcc ttg ctt ctg cac tgg ggt gcg ata	676
Glu Ile Ser Tyr Ser Ser Asn Ser Leu Leu Leu His Trp Gly Ala Ile	
125 130 135 140	
cgt gac aaa aag gaa aag tgg gta ctt cct tct cgt ccg cca gat ggg	724
Arg Asp Lys Lys Glu Lys Trp Val Leu Pro Ser Arg Pro Pro Asp Gly	
145 150 155	
acc aaa ata tta aag aat aga gcc ctt aga act ccc ttt gtg agc tct	772
Thr Lys Ile Leu Lys Asn Arg Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Ser Ser	
160 165 170	
ggg tcc aaa tct ctc gtt aaa tta gag ata gat gat cct gca ata gaa	820
Gly Ser Lys Ser Leu Val Lys Leu Glu Ile Asp Asp Pro Ala Ile Glu	
175 180 185	
gca gta gag ttt ctt ata ctc gat gaa gcc cag aat aaa tgg ttc aaa	868
Ala Val Glu Phe Leu Ile Leu Asp Glu Ala Gln Asn Lys Trp Phe Lys	
190 195 200	
aac aat ggt gca aat ttt cat gta aag tta cca tca gag agg agt ttg	916
Asn Asn Gly Ala Asn Phe His Val Lys Leu Pro Ser Glu Arg Ser Leu	
205 210 215 220	
att caa aat gtt tca gtt cct gaa gat ctt gta cag act caa gca tat	964

Ile Gln Asn Val Ser Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Thr Gln Ala Tyr	
225 230 235	
tta agg tgg gaa aga aag ggt aaa cag att tat act cct gaa caa gag	1012
Leu Arg Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Ile Tyr Thr Pro Glu Gln Glu	
240 245 250	
aag gag gag tat gaa gca gct cgc act gag ctg ctg gaa gaa att gtt	1060
Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Glu Leu Leu Glu Glu Ile Val	
255 260 265	
aga ggt act tct gtg gag gac ctg cga gca aaa cta aca aac aaa aat	1108
Arg Gly Thr Ser Val Glu Asp Leu Arg Ala Lys Leu Thr Asn Lys Asn	
270 275 280	
gat aga caa gaa att aag gaa tct tct tcc cat gga aca aaa aat gcg	1156
Asp Arg Gln Glu Ile Lys Glu Ser Ser Ser His Gly Thr Lys Asn Ala	
285 290 295 300	
ata ccg gat gat ctt gtg caa ata caa tct tat ata cgg tgg gag aga	1204
Ile Pro Asp Asp Leu Val Gln Ile Gln Ser Tyr Ile Arg Trp Glu Arg	
305 310 315	
gct ggg aag ccc aat tac tct gca gac caa cag ctt aga gaa ttt gag	1252
Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Ser Ala Asp Gln Gln Leu Arg Glu Phe Glu	
320 325 330	
gaa gca aga aaa gaa ttg caa tct gaa cta gag aag ggt atc tct ctt	1300
Glu Ala Arg Lys Glu Leu Gln Ser Glu Leu Glu Lys Gly Ile Ser Leu	
335 340 345	
gat gaa ata tgg aaa aag att aca aaa ggg gag atc cag act aag gtc	1348
Asp Glu Ile Trp Lys Lys Ile Thr Lys Gly Glu Ile Gln Thr Lys Val	
350 355 360	
tct gat caa ctt aaa act aaa aag tat ttt aga act gaa agg att cag	1396
Ser Asp Gln Leu Lys Thr Lys Lys Tyr Phe Arg Thr Glu Arg Ile Gln	
365 370 375 380	
agg aag cag agg gac ttt atg cag att cta aac aaa cat gtg gct gaa	1444
Arg Lys Gln Arg Asp Phe Met Gln Ile Leu Asn Lys His Val Ala Glu	
385 390 395	
ccc aca gag aag aag aat att tca gtt gaa cca aaa gcc ttg aca cca	1492
Pro Thr Glu Lys Lys Asn Ile Ser Val Glu Pro Lys Ala Leu Thr Pro	
400 405 410	
gtt gaa ctt ttc gtc ggg gca act gaa gaa cag gag ggt gat tct att	1540
Val Glu Leu Phe Val Gly Ala Thr Glu Glu Gln Glu Gly Asp Ser Ile	
415 420 425	
ctt aac aag aag atc tac aag ctt gct ggc aaa gaa ctt ctg gta ctt	1588
Leu Asn Lys Lys Ile Tyr Lys Leu Ala Gly Lys Glu Leu Leu Val Leu	
430 435 440	
gtg cac aag cct ggt ggc aag acc aaa att cac cta gct act gat ggc	1636
Val His Lys Pro Gly Gly Lys Thr Lys Ile His Leu Ala Thr Asp Gly	

445	450	455	460	
aaa gag cca ctc att ctc cac tgg gct ttg tct aag aag gct gga gaa Lys Glu Pro Leu Ile Leu His Trp Ala Leu Ser Lys Lys Ala Gly Glu	465	470	475	1684
tgg ttg gct ccg cct cca agt gta ctg cct gca ggt tca gtt ttg ctg Trp Leu Ala Pro Pro Pro Ser Val Leu Pro Ala Gly Ser Val Leu Leu	480	485	490	1732
agt ggg tca gtt gaa aca aca ttc aca act agc tct ctt gcg gat ctg Ser Gly Ser Val Glu Thr Thr Phe Thr Thr Ser Ser Leu Ala Asp Leu	495	500	505	1780
cct tat cag gtc caa tca att gaa ata gag att gaa gaa gaa ggt tat Pro Tyr Gln Val Gln Ser Ile Glu Ile Glu Ile Glu Glu Glu Gly Tyr	510	515	520	1828
gtt gga atg cca tct gtc ctt cag tct ggc gga aac tgg ata aag aat Val Gly Met Pro Ser Val Leu Gln Ser Gly Gly Asn Trp Ile Lys Asn	525	530	535	1876
aag ggc tct gac ttc tat gtt gac ttt agc tat gaa tct aag caa gtt Lys Gly Ser Asp Phe Tyr Val Asp Phe Ser Tyr Glu Ser Lys Gln Val	545	550	555	1924
caa cag gat ttt ggc gat ggc aaa ggt acg gcc aag gct ttg ttg gag Gln Gln Asp Phe Gly Asp Gly Lys Gly Thr Ala Lys Ala Leu Leu Glu	560	565	570	1972
aaa ata gca gga ttg gaa att gag gca cag aag tcc ttt atg cac cgg Lys Ile Ala Gly Leu Glu Ile Glu Ala Gln Lys Ser Phe Met His Arg	575	580	585	2020
ttt aac att gca gca gac ttg ata caa gaa gcc aaa gag gct ggt gaa Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Ile Gln Glu Ala Lys Glu Ala Gly Glu	590	595	600	2068
ctg ggc ttt gct ggg atc ttg gtg tgg atg agg ttt atg gct aca agg Leu Gly Phe Ala Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe Met Ala Thr Arg	605	610	615	2116
cag cta ata tgg aat aaa aac tac aat gtt aaa cca cgt gaa atc agt Gln Leu Ile Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser	625	630	635	2164
aaa gcc cag gat agg ctt aca gac ctg ctc cag aat gtc tac att agt Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asn Val Tyr Ile Ser	640	645	650	2212
aat cca gag tat agg gaa att gtg cgc atg att ttg tct act gtt ggc Asn Pro Glu Tyr Arg Glu Ile Val Arg Met Ile Leu Ser Thr Val Gly	655	660	665	2260
cgt gga ggt gaa gga gat gtg gga cag cga att cgc gat gaa atc ctg Arg Gly Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu	670	675	680	2308

gtt atc cag aga aac aat aat tgc aag ggt gga atg atg gaa gaa tgg Val Ile Gln Arg Asn Asn Asn Cys Lys Gly Gly Met Met Glu Glu Trp 685 690 695 700	2356
cat cag aag ttg cat aat aac act agt cct gat gat gtt ata att tgt His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val Ile Ile Cys 705 710 715	2404
cag gca ttg att gat tat att aaa agt gac ttc gac atc agt gcc tac Gln Ala Leu Ile Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Ile Ser Ala Tyr 720 725 730	2452
tgg aag act ttg aat gac aat ggc att acg aaa gaa cgt ctt cta agt Trp Lys Thr Leu Asn Asp Asn Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser 735 740 745	2500
tat gat cgt gcg atc cat tct gag cca aac ttc aga aga gat cag aag Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Arg Asp Gln Lys 750 755 760	2548
gat ggt ctg ctg cgt gac cta gga aac tac atg aga acc tta aag gcg Asp Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly Asn Tyr Met Arg Thr Leu Lys Ala 765 770 775 780	2596
gtt cat tca ggt gca gat ctt gag tct gct atc acg aat tgc ttg ggc Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Thr Asn Cys Leu Gly 785 790 795	2644
tac aga tct gag ggt caa ggg ttc atg gtc ggg gtg cag ata aat cct Tyr Arg Ser Glu Gly Gln Gly Phe Met Val Gly Val Gln Ile Asn Pro 800 805 810	2692
ata ccg aac ttg cca tct gga ttt cca gaa ttg ctt caa ttt gtc tct Ile Pro Asn Leu Pro Ser Gly Phe Pro Glu Leu Leu Gln Phe Val Ser 815 820 825	2740
gag cat gtt gaa gat aga aat gta gaa gca ttg ctt gag ggt ttg ctg Glu His Val Glu Asp Arg Asn Val Glu Ala Leu Leu Glu Gly Leu Leu 830 835 840	2788
gag gct cgt caa gag att cgg cca ttg ctg tgc aag cac aat gat cgt Glu Ala Arg Gln Glu Ile Arg Pro Leu Leu Cys Lys His Asn Asp Arg 845 850 855 860	2836
ctg aag gat cta tta ttt ttg gac ata gcc ctt gag tct agt gtt agg Leu Lys Asp Leu Leu Phe Leu Asp Ile Ala Leu Glu Ser Ser Val Arg 865 870 875	2884
aca gct att gaa aaa gga tac gag gaa ttg aac gag gct gga ccg gag Thr Ala Ile Glu Lys Gly Tyr Glu Glu Leu Asn Glu Ala Gly Pro Glu 880 885 890	2932
aaa atc atg tac ttt gtc tct ctg att ctt gaa aat ctc gca ctt tca Lys Ile Met Tyr Phe Val Ser Leu Ile Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser 895 900 905	2980

tta gat gac aat gag gat ctc atc tac tgt tta aag ggt tgg agt aat Leu Asp Asp Asn Glu Asp Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Ser Asn 910 915 920	3028
gct tta agc atg tcc aag agt aaa agt gat aac tgg gca tta ttt gca Ala Leu Ser Met Ser Lys Ser Lys Ser Asp Asn Trp Ala Leu Phe Ala 925 930 935 940	3076
aaa tca gtt ctt gac aga act cgc ctt gca ctc gcc ggc aag gca gac Lys Ser Val Leu Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala Gly Lys Ala Asp 945 950 955	3124
tgg tac cag aaa gtt ttg caa cct tcg gca gag tat ctt gga acg ctg Trp Tyr Gln Lys Val Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Thr Leu 960 965 970	3172
ttg agt gtt gat aag tgg gct gtg gac ata ttt aca gaa gaa atg atc Leu Ser Val Asp Lys Trp Ala Val Asp Ile Phe Thr Glu Glu Met Ile 975 980 985	3220
cgt gct gga tca gct gca gct cta tcc tta ctc ctt aat cga ctt gat Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ala Leu Ser Leu Leu Leu Asn Arg Leu Asp 990 995 1000	3268
cca gtt ctt cgg aag aca gct agt ctg gga agt tgg cag gtt atc Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Ser Leu Gly Ser Trp Gln Val Ile 1005 1010 1015	3313
agc cct gtt gaa gtt ttt gga tat gtc gca gtt gtg gat gag tta Ser Pro Val Glu Val Phe Gly Tyr Val Ala Val Val Asp Glu Leu 1020 1025 1030	3358
cta gct gtg cag gat aaa tct tat gat cag cct aca ata tta ctg Leu Ala Val Gln Asp Lys Ser Tyr Asp Gln Pro Thr Ile Leu Leu 1035 1040 1045	3403
gca aga cgt gta aaa gga gag gaa gaa att cca cat ggc aca gtt Ala Arg Arg Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro His Gly Thr Val 1050 1055 1060	3448
gct gta ctg aca gcg gat atg cca gat gtc cta tca cat gtt tca Ala Val Leu Thr Ala Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser 1065 1070 1075	3493
gtt cga gct aga aat tgc aag gtt tgc ttc gct aca tgc ttt gat Val Arg Ala Arg Asn Cys Lys Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp 1080 1085 1090	3538
ccc aat atc ttg gct gac cta caa tca aat gaa ggg aaa atg ctg Pro Asn Ile Leu Ala Asp Leu Gln Ser Asn Glu Gly Lys Met Leu 1095 1100 1105	3583
cac cta aaa cca aca tct gct gat att gca tat agt gtg gtg gag His Leu Lys Pro Thr Ser Ala Asp Ile Ala Tyr Ser Val Val Glu 1110 1115 1120	3628
ggc agt gag cta caa gat tca agt tca gct aac ttg aaa gaa gaa	3673

Gly 1125	Ser	Glu	Leu	Gln	Asp 1130	Ser	Ser	Ser	Ala	Asn 1135	Leu	Lys	Glu	Glu	
gat 1140	ggt	cct	tca	tct	tct	ggt	gca	tta	gtc	aaa	aag	cag	ttt	gct	3718
Asp 1140	Gly	Pro	Ser	Ser	Ser	Val	Ala	Leu	Val	Lys	Lys	Gln	Phe	Ala	
1145					1145					1150					
ggc 1155	aga	tat	gct	ata	aca	tct	gat	gag	ttc	act	ggt	gaa	ctg	gtg	3763
Gly 1155	Arg	Tyr	Ala	Ile	Thr	Ser	Asp	Glu	Phe	Thr	Gly	Glu	Leu	Val	
					1160					1165					
ggt 1170	gct	aaa	tca	cgt	aat	att	gca	tat	ctg	aaa	gga	aaa	gta	ccg	3808
Gly 1170	Ala	Lys	Ser	Arg	Asn	Ile	Ala	Tyr	Leu	Lys	Gly	Lys	Val	Pro	
					1175					1180					
tct 1185	tgg	att	ggg	att	ccg	aca	tca	gtt	gcc	cta	cca	ttt	gga	gtg	3853
Ser 1185	Trp	Ile	Gly	Ile	Pro	Thr	Ser	Val	Ala	Leu	Pro	Phe	Gly	Val	
					1190					1195					
ttt 1200	gag	aag	gtt	ctt	tca	gat	gac	ata	aat	cag	gca	gtg	gca	gag	3898
Phe 1200	Glu	Lys	Val	Leu	Ser	Asp	Asp	Ile	Asn	Gln	Ala	Val	Ala	Glu	
					1205					1210					
aag 1215	ttg	caa	att	ttg	aaa	caa	aag	tta	gga	gag	gaa	gac	cat	agt	3943
Lys 1215	Leu	Gln	Ile	Leu	Lys	Gln	Lys	Leu	Gly	Glu	Glu	Asp	His	Ser	
					1220					1225					
gcc 1230	ctt	agg	gag	att	cgg	gaa	aca	gtt	tta	cag	atg	aaa	gca	cca	3988
Ala 1230	Leu	Arg	Glu	Ile	Arg	Glu	Thr	Val	Leu	Gln	Met	Lys	Ala	Pro	
					1235					1240					
aac 1245	cag	ttg	gtc	caa	gaa	ctg	aag	aca	gag	atg	aaa	agt	tct	ggt	4033
Asn 1245	Gln	Leu	Val	Gln	Glu	Leu	Lys	Thr	Glu	Met	Lys	Ser	Ser	Gly	
					1250					1255					
atg 1260	cct	tgg	cct	ggt	gat	gaa	ggt	gag	cag	cgc	tgg	gag	caa	gca	4078
Met 1260	Pro	Trp	Pro	Gly	Asp	Glu	Gly	Glu	Gln	Arg	Trp	Glu	Gln	Ala	
					1265					1270					
tgg 1275	atg	gct	atc	aag	aag	gtc	tgg	gct	tca	aaa	tgg	aat	gag	aga	4123
Trp 1275	Met	Ala	Ile	Lys	Lys	Val	Trp	Ala	Ser	Lys	Trp	Asn	Glu	Arg	
					1280					1285					
gca 1290	ttc	ttc	agc	aca	agg	aga	gta	aaa	tta	gat	cat	gaa	tat	ctc	4168
Ala 1290	Phe	Phe	Ser	Thr	Arg	Arg	Val	Lys	Leu	Asp	His	Glu	Tyr	Leu	
					1295					1300					
tgc 1305	atg	gct	gtc	ctg	gtt	cag	gaa	ata	atc	aat	gct	gac	tat	gca	4213
Cys 1305	Met	Ala	Val	Leu	Val	Gln	Glu	Ile	Ile	Asn	Ala	Asp	Tyr	Ala	
					1310					1315					
ttt 1320	gtt	atc	cat	aca	act	aat	ccc	tct	tca	gga	gat	tca	tca	gaa	4258
Phe 1320	Val	Ile	His	Thr	Thr	Asn	Pro	Ser	Ser	Gly	Asp	Ser	Ser	Glu	
					1325					1330					
ata 1330	tat	gct	gag	gtg	gtg	aag	gga	ctt	gga	gaa	act	ctc	gtt	gga	4303
Ile 1330	Tyr	Ala	Glu	Val	Val	Lys	Gly	Leu	Gly	Glu	Thr	Leu	Val	Gly	

1335	1340	1345	
gct tat cca ggc cgt gct	ttg agt ttt gtc tgc	aag aaa aat gat	4348
Ala Tyr Pro Gly Arg Ala	Leu Ser Phe Val Cys	Lys Lys Asn Asp	
1350	1355	1360	
ttg aag tct cct cgg gtt	ttg ggt tat cca agc	aag ccc att ggg	4393
Leu Lys Ser Pro Arg Val	Leu Gly Tyr Pro Ser	Lys Pro Ile Gly	
1365	1370	1375	
ctt ttt ata aga cga tca	atc atc ttc cga tct	gat tcc aat ggt	4438
Leu Phe Ile Arg Arg Ser	Ile Ile Phe Arg Ser	Asp Ser Asn Gly	
1380	1385	1390	
gaa gat ctg gaa ggt tat	gct ggt gct ggc ctt	tat gat agt gtg	4483
Glu Asp Leu Glu Gly Tyr	Ala Gly Ala Gly Leu	Tyr Asp Ser Val	
1395	1400	1405	
cca atg gat gaa gcc gag	aaa gtt gtg ctt gat	tac tct tca gac	4528
Pro Met Asp Glu Ala Glu	Lys Val Val Leu Asp	Tyr Ser Ser Asp	
1410	1415	1420	
cat ctg atc act gac gga	cac ttc cag caa tca	att ctc tct tcc	4573
His Leu Ile Thr Asp Gly	His Phe Gln Gln Ser	Ile Leu Ser Ser	
1425	1430	1435	
att gct cgt gca gga tgt	gag att gag gag cta	ttt gga tct gca	4618
Ile Ala Arg Ala Gly Cys	Glu Ile Glu Glu Leu	Phe Gly Ser Ala	
1440	1445	1450	
caa gac att gaa ggt gtg	gtt agg gat ggg aaa	ata tat gtt gtc	4663
Gln Asp Ile Glu Gly Val	Val Arg Asp Gly Lys	Ile Tyr Val Val	
1455	1460	1465	
cag aca aga ccc caa atg	tga ggctgttctt tttctttttt	atttttttct	4714
Gln Thr Arg Pro Gln Met			
1470	1475		
gattgggaag ctattgataa aagcattata tcaatgaaaa aaattaaaaa gaaattatag			4774
aggtaagcc tagaaaggag gaaaggggag tgagtattta tttggaagca agtgaaataa			4834
aggtaaaaa ggagagagga ataaagttgc aatttcccag aacatgtaaa ttcacttgga			4894
aattgtgtac tggatgcttt gctctgtatg aagactaccg ggtcgaaatg acaacatttt			4954
tgtccatagg catgtaatgt tacatttgat tctgggtaat accatacgct tcattatagg			5014
ggatcagcag atactatggt gtagttgaaa tgtaatgtta taataaaatg ttaatacaaa			5074
tgttataaca tttgtattaa cctgtaacgt gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa			5124

<210> 7
 <211> 1475
 <212> PRT
 <213> Citrus reticulata

<400> 7

Met Ser Asn Ser Ile Gly Arg Asn Val Leu His Gln Ser Leu Leu Cys
1 5 10 15

Ser Thr Val Phe Glu His Gln Ser Asn Arg His Ser Ser Gly Ile Pro
20 25 30

Ala Asn Ser Leu Phe Gln Ala Val Ser Ile Asn Gln Pro Ala Gly Ala
35 40 45

Ser Ala Ala Arg Lys Ser Pro Leu Ser Thr Lys Phe Tyr Gly Thr Ser
50 55 60

Leu Asn Ala Arg Pro Lys Met Ala Met Gly Arg His Arg Pro Val Leu
65 70 75 80

Ile Thr Pro Arg Ala Val Leu Ala Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Ala
85 90 95

Gly Lys Phe Asn Leu Glu Gly Asn Val Glu Leu Gln Ile Thr Val Gly
100 105 110

Ala Pro Thr Pro Gly Ser Leu Thr Gln Val Asn Ile Glu Ile Ser Tyr
115 120 125

Ser Ser Asn Ser Leu Leu Leu His Trp Gly Ala Ile Arg Asp Lys Lys
130 135 140

Glu Lys Trp Val Leu Pro Ser Arg Pro Pro Asp Gly Thr Lys Ile Leu
145 150 155 160

Lys Asn Arg Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Ser Ser Gly Ser Lys Ser
165 170 175

Leu Val Lys Leu Glu Ile Asp Asp Pro Ala Ile Glu Ala Val Glu Phe
180 185 190

Leu Ile Leu Asp Glu Ala Gln Asn Lys Trp Phe Lys Asn Asn Gly Ala
195 200 205

Asn Phe His Val Lys Leu Pro Ser Glu Arg Ser Leu Ile Gln Asn Val
210 215 220

Ser Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Thr Gln Ala Tyr Leu Arg Trp Glu
 225 230 235 240

Arg Lys Gly Lys Gln Ile Tyr Thr Pro Glu Gln Glu Lys Glu Glu Tyr
 245 250 255

Glu Ala Ala Arg Thr Glu Leu Leu Glu Glu Ile Val Arg Gly Thr Ser
 260 265 270

Val Glu Asp Leu Arg Ala Lys Leu Thr Asn Lys Asn Asp Arg Gln Glu
 275 280 285

Ile Lys Glu Ser Ser Ser His Gly Thr Lys Asn Ala Ile Pro Asp Asp
 290 295 300

Leu Val Gln Ile Gln Ser Tyr Ile Arg Trp Glu Arg Ala Gly Lys Pro
 305 310 315 320

Asn Tyr Ser Ala Asp Gln Gln Leu Arg Glu Phe Glu Glu Ala Arg Lys
 325 330 335

Glu Leu Gln Ser Glu Leu Glu Lys Gly Ile Ser Leu Asp Glu Ile Trp
 340 345 350

Lys Lys Ile Thr Lys Gly Glu Ile Gln Thr Lys Val Ser Asp Gln Leu
 355 360 365

Lys Thr Lys Lys Tyr Phe Arg Thr Glu Arg Ile Gln Arg Lys Gln Arg
 370 375 380

Asp Phe Met Gln Ile Leu Asn Lys His Val Ala Glu Pro Thr Glu Lys
 385 390 395 400

Lys Asn Ile Ser Val Glu Pro Lys Ala Leu Thr Pro Val Glu Leu Phe
 405 410 415

Val Gly Ala Thr Glu Glu Gln Glu Gly Asp Ser Ile Leu Asn Lys Lys
 420 425 430

Ile Tyr Lys Leu Ala Gly Lys Glu Leu Leu Val Leu Val His Lys Pro
 435 440 445

Gly Gly Lys Thr Lys Ile His Leu Ala Thr Asp Gly Lys Glu Pro Leu
450 455 460

Ile Leu His Trp Ala Leu Ser Lys Lys Ala Gly Glu Trp Leu Ala Pro
465 470 475 480

Pro Pro Ser Val Leu Pro Ala Gly Ser Val Leu Leu Ser Gly Ser Val
485 490 495

Glu Thr Thr Phe Thr Thr Ser Ser Leu Ala Asp Leu Pro Tyr Gln Val
500 505 510

Gln Ser Ile Glu Ile Glu Ile Glu Glu Glu Gly Tyr Val Gly Met Pro
515 520 525

Ser Val Leu Gln Ser Gly Gly Asn Trp Ile Lys Asn Lys Gly Ser Asp
530 535 540

Phe Tyr Val Asp Phe Ser Tyr Glu Ser Lys Gln Val Gln Gln Asp Phe
545 550 555 560

Gly Asp Gly Lys Gly Thr Ala Lys Ala Leu Leu Glu Lys Ile Ala Gly
565 570 575

Leu Glu Ile Glu Ala Gln Lys Ser Phe Met His Arg Phe Asn Ile Ala
580 585 590

Ala Asp Leu Ile Gln Glu Ala Lys Glu Ala Gly Glu Leu Gly Phe Ala
595 600 605

Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe Met Ala Thr Arg Gln Leu Ile Trp
610 615 620

Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp
625 630 635 640

Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asn Val Tyr Ile Ser Asn Pro Glu Tyr
645 650 655

Arg Glu Ile Val Arg Met Ile Leu Ser Thr Val Gly Arg Gly Gly Glu
660 665 670

Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg
675 680 685

Asn Asn Asn Cys Lys Gly Gly Met Met Glu Glu Trp His Gln Lys Leu
690 695 700

His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val Ile Ile Cys Gln Ala Leu Ile
705 710 715 720

Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Ile Ser Ala Tyr Trp Lys Thr Leu
725 730 735

Asn Asp Asn Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Ala
740 745 750

Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Arg Asp Gln Lys Asp Gly Leu Leu
755 760 765

Arg Asp Leu Gly Asn Tyr Met Arg Thr Leu Lys Ala Val His Ser Gly
770 775 780

Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Thr Asn Cys Leu Gly Tyr Arg Ser Glu
785 790 795 800

Gly Gln Gly Phe Met Val Gly Val Gln Ile Asn Pro Ile Pro Asn Leu
805 810 815

Pro Ser Gly Phe Pro Glu Leu Leu Gln Phe Val Ser Glu His Val Glu
820 825 830

Asp Arg Asn Val Glu Ala Leu Leu Glu Gly Leu Leu Glu Ala Arg Gln
835 840 845

Glu Ile Arg Pro Leu Leu Cys Lys His Asn Asp Arg Leu Lys Asp Leu
850 855 860

Leu Phe Leu Asp Ile Ala Leu Glu Ser Ser Val Arg Thr Ala Ile Glu
865 870 875 880

Lys Gly Tyr Glu Glu Leu Asn Glu Ala Gly Pro Glu Lys Ile Met Tyr
885 890 895

Phe Val Ser Leu Ile Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser Leu Asp Asp Asn

900

905

910

Glu Asp Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Ser Asn Ala Leu Ser Met
 915 920 925

Ser Lys Ser Lys Ser Asp Asn Trp Ala Leu Phe Ala Lys Ser Val Leu
 930 935 940

Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala Gly Lys Ala Asp Trp Tyr Gln Lys
 945 950 955 960

Val Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Thr Leu Leu Ser Val Asp
 965 970 975

Lys Trp Ala Val Asp Ile Phe Thr Glu Glu Met Ile Arg Ala Gly Ser
 980 985 990

Ala Ala Ala Leu Ser Leu Leu Leu Asn Arg Leu Asp Pro Val Leu Arg
 995 1000 1005

Lys Thr Ala Ser Leu Gly Ser Trp Gln Val Ile Ser Pro Val Glu
 1010 1015 1020

Val Phe Gly Tyr Val Ala Val Val Asp Glu Leu Leu Ala Val Gln
 1025 1030 1035

Asp Lys Ser Tyr Asp Gln Pro Thr Ile Leu Leu Ala Arg Arg Val
 1040 1045 1050

Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro His Gly Thr Val Ala Val Leu Thr
 1055 1060 1065

Ala Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala Arg
 1070 1075 1080

Asn Cys Lys Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn Ile Leu
 1085 1090 1095

Ala Asp Leu Gln Ser Asn Glu Gly Lys Met Leu His Leu Lys Pro
 1100 1105 1110

Thr Ser Ala Asp Ile Ala Tyr Ser Val Val Glu Gly Ser Glu Leu
 1115 1120 1125

Gln Asp Ser Ser Ser Ala Asn Leu Lys Glu Glu Asp Gly Pro Ser
1130 1135 1140

Ser Ser Val Ala Leu Val Lys Lys Gln Phe Ala Gly Arg Tyr Ala
1145 1150 1155

Ile Thr Ser Asp Glu Phe Thr Gly Glu Leu Val Gly Ala Lys Ser
1160 1165 1170

Arg Asn Ile Ala Tyr Leu Lys Gly Lys Val Pro Ser Trp Ile Gly
1175 1180 1185

Ile Pro Thr Ser Val Ala Leu Pro Phe Gly Val Phe Glu Lys Val
1190 1195 1200

Leu Ser Asp Asp Ile Asn Gln Ala Val Ala Glu Lys Leu Gln Ile
1205 1210 1215

Leu Lys Gln Lys Leu Gly Glu Glu Asp His Ser Ala Leu Arg Glu
1220 1225 1230

Ile Arg Glu Thr Val Leu Gln Met Lys Ala Pro Asn Gln Leu Val
1235 1240 1245

Gln Glu Leu Lys Thr Glu Met Lys Ser Ser Gly Met Pro Trp Pro
1250 1255 1260

Gly Asp Glu Gly Glu Gln Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala Ile
1265 1270 1275

Lys Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Phe Phe Ser
1280 1285 1290

Thr Arg Arg Val Lys Leu Asp His Glu Tyr Leu Cys Met Ala Val
1295 1300 1305

Leu Val Gln Glu Ile Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His
1310 1315 1320

Thr Thr Asn Pro Ser Ser Gly Asp Ser Ser Glu Ile Tyr Ala Glu
1325 1330 1335

Val Val Lys Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly
1340 1345 1350

Arg Ala Leu Ser Phe Val Cys Lys Lys Asn Asp Leu Lys Ser Pro
1355 1360 1365

Arg Val Leu Gly Tyr Pro Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Arg
1370 1375 1380

Arg Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu
1385 1390 1395

Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu
1400 1405 1410

Ala Glu Lys Val Val Leu Asp Tyr Ser Ser Asp His Leu Ile Thr
1415 1420 1425

Asp Gly His Phe Gln Gln Ser Ile Leu Ser Ser Ile Ala Arg Ala
1430 1435 1440

Gly Cys Glu Ile Glu Glu Leu Phe Gly Ser Ala Gln Asp Ile Glu
1445 1450 1455

Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val Gln Thr Arg Pro
1460 1465 1470

Gln Met
1475

<210> 8
<211> 4200
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(4200)
<223>

<300>
<308> EMBL / AF312027
<309> 2001-01-08

<400> 8

atg agt aac tct gta gtg cat aac tta ctt aac cgg ggt ttg att cgt Met Ser Asn Ser Val Val His Asn Leu Leu Asn Arg Gly Leu Ile Arg 1 5 10 15	48
cct ctt aac ttt gaa cat caa aac aag ctc aac tcc tct gtg tac caa Pro Leu Asn Phe Glu His Gln Asn Lys Leu Asn Ser Ser Val Tyr Gln 20 25 30	96
act tca aca gca aat ccg gct ctt ggc aag att ggc aga tca aaa ctt Thr Ser Thr Ala Asn Pro Ala Leu Gly Lys Ile Gly Arg Ser Lys Leu 35 40 45	144
tac ggg aaa ggt ctt aag cag gca gga cgc agt ctg gtc act gaa aca Tyr Gly Lys Gly Leu Lys Gln Ala Gly Arg Ser Leu Val Thr Glu Thr 50 55 60	192
gga gga aga cct ctc tca ttt gtt cca cga gct gtc ctt gcc atg gat Gly Gly Arg Pro Leu Ser Phe Val Pro Arg Ala Val Leu Ala Met Asp 65 70 75 80	240
cct cag gca gcc gag aaa ttt agt ctt gac gga aat atc gat tta ctg Pro Gln Ala Ala Glu Lys Phe Ser Leu Asp Gly Asn Ile Asp Leu Leu 85 90 95	288
gtt gaa gtc act tct aca act gta aga gaa gta aat atc cag ata gct Val Glu Val Thr Ser Thr Thr Val Arg Glu Val Asn Ile Gln Ile Ala 100 105 110	336
tat aca agt gac aca ttg ttc cta cac tgg ggt gca att ctt gac aac Tyr Thr Ser Asp Thr Leu Phe Leu His Trp Gly Ala Ile Leu Asp Asn 115 120 125	384
aaa gaa aat tgg gtt cta cct tct cgc tct ccg gat aga act caa aac Lys Glu Asn Trp Val Leu Pro Ser Arg Ser Pro Asp Arg Thr Gln Asn 130 135 140	432
ttc aag aac agt gcg ctt aga act cca ttt gtg aaa tcc ggt ggc aat Phe Lys Asn Ser Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Lys Ser Gly Gly Asn 145 150 155 160	480
tct cac ctt aaa cta gag ata gat gat cct gcc ata cac gct att gag Ser His Leu Lys Leu Glu Ile Asp Asp Pro Ala Ile His Ala Ile Glu 165 170 175	528
ttc ctt ata ttt gac gaa agt cgg aac aaa tgg tat aaa aat aat ggt Phe Leu Ile Phe Asp Glu Ser Arg Asn Lys Trp Tyr Lys Asn Asn Gly 180 185 190	576
cag aat ttt cat ata aac tta cca acg gaa agg aat gtg aaa caa aat Gln Asn Phe His Ile Asn Leu Pro Thr Glu Arg Asn Val Lys Gln Asn 195 200 205	624
gtt tct gtt cct gaa gat ctt gta cag atc caa gca tat ctt aga tgg Val Ser Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Ile Gln Ala Tyr Leu Arg Trp 210 215 220	672
gaa cgt aag ggt aaa caa atg tac aac cct gag aaa gag aag gag gag	720

450	455	460	
att aaa aat aat gac agt gac ttt tat gtg gac ttt gct aaa gaa gaa Ile Lys Asn Asn Asp Ser Asp Phe Tyr Val Asp Phe Ala Lys Glu Glu 465 470 475 480			1440
aaa cat gtt cag aag gat tat ggc gat gga aag ggt aca gcc aag cat Lys His Val Gln Lys Asp Tyr Gly Asp Gly Lys Gly Thr Ala Lys His 485 490 495			1488
tta ctg gac aaa atc gca gat ttg gag agt gag gcc cag aag tct ttc Leu Leu Asp Lys Ile Ala Asp Leu Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser Phe 500 505 510			1536
atg cat cga ttc aac att gca gca gat ctt gtg gac gag gca aaa agt Met His Arg Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Val Asp Glu Ala Lys Ser 515 520 525			1584
gct ggt caa ctg ggc ttt gca ggg atc cta gtc tgg atg agg ttt atg Ala Gly Gln Leu Gly Phe Ala Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe Met 530 535 540			1632
gct aca aga cag ctt gtg tgg aac aaa aac tat aat gtt aag cca agg Ala Thr Arg Gln Leu Val Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg 545 550 555 560			1680
gag ata agc aaa gcg cag gat aga ctg act gac ctt ctc cag gac gtt Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asp Val 565 570 575			1728
tat gca agt tat cca gag tac aga gaa ctt ttg cgg atg ata atg tct Tyr Ala Ser Tyr Pro Glu Tyr Arg Glu Leu Leu Arg Met Ile Met Ser 580 585 590			1776
act gta ggt cga gga ggt gaa gga gat gtc ggg caa cga atc cgt gac Thr Val Gly Arg Gly Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp 595 600 605			1824
gaa att cta gtc atc cag cgg aaa aat gac tgc aag ggt gga att atg Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg Lys Asn Asp Cys Lys Gly Gly Ile Met 610 615 620			1872
gag gaa tgg cat cag aag ttg cat aac aac act agt cca gat gat gtt Glu Glu Trp His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val 625 630 635 640			1920
gtc atc tgt cag gca ttg atg gat tat atc aaa agt gac ttt gac tta Val Ile Cys Gln Ala Leu Met Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Leu 645 650 655			1968
agt gtt tac tgg aag acc ttg aac gat aat ggc ata acc aaa gag cga Ser Val Tyr Trp Lys Thr Leu Asn Asp Asn Gly Ile Thr Lys Glu Arg 660 665 670			2016
ctc tta agt tat gat cgt gct ata cat tct gaa cca aat ttt aga gga Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Gly 675 680 685			2064

gaa caa aaa gac ggt ctt ttg cgt gat ctt gga cac tac atg agg act	2112
Glu Gln Lys Asp Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly His Tyr Met Arg Thr	
690 695 700	
tta aag gct gtt cat tca ggg gca gac ctt gag tcg gct ata caa aat	2160
Leu Lys Ala Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Gln Asn	
705 710 715 720	
tgc atg ggc tac caa gat gac ggt gaa ggt ttc atg gtt ggg gtg cag	2208
Cys Met Gly Tyr Gln Asp Asp Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val Gln	
725 730 735	
ata aat cct gta tca gga ttg cct tct gga tat cca gac ttg ctt cgt	2256
Ile Asn Pro Val Ser Gly Leu Pro Ser Gly Tyr Pro Asp Leu Leu Arg	
740 745 750	
ttc gtc cta gaa cat gtt gaa gaa aag aat gta gag cca ctt ctt gag	2304
Phe Val Leu Glu His Val Glu Glu Lys Asn Val Glu Pro Leu Leu Glu	
755 760 765	
ggt ttg ctt gaa gct cgt caa gag cta agg cca ctt ctg ctg aag tcc	2352
Gly Leu Leu Glu Ala Arg Gln Glu Leu Arg Pro Leu Leu Leu Lys Ser	
770 775 780	
cat gac cgc ctc aag gat ctg tta ttc ttg gac ctc gct ctt gat tct	2400
His Asp Arg Leu Lys Asp Leu Leu Phe Leu Asp Leu Ala Leu Asp Ser	
785 790 795 800	
act gtc aga aca gcg att gaa aga gga tat gag caa ttg aat gat gct	2448
Thr Val Arg Thr Ala Ile Glu Arg Gly Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ala	
805 810 815	
gga cct gag aaa atc atg tac ttc atc agc cta gtt ctt gaa aat ctt	2496
Gly Pro Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu	
820 825 830	
gcc ctc tct tca gat gac aat gaa gac ctt ata tac tgc ttg aag gga	2544
Ala Leu Ser Ser Asp Asp Asn Glu Asp Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Gly	
835 840 845	
tgg caa ttt gcc ctc gac atg tgc aag agc aaa aaa gat cac tgg gct	2592
Trp Gln Phe Ala Leu Asp Met Cys Lys Ser Lys Lys Asp His Trp Ala	
850 855 860	
ctg tat gca aaa tct gtt ctt gac aga agc cga cta gca ctg gca agc	2640
Leu Tyr Ala Lys Ser Val Leu Asp Arg Ser Arg Leu Ala Leu Ala Ser	
865 870 875 880	
aaa gct gag agg tac ctt gaa att ctg caa cca tcg gct gaa tat ctt	2688
Lys Ala Glu Arg Tyr Leu Glu Ile Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu	
885 890 895	
gga tct tgt ctt gga gtc gat cag tcg gct gtt agt ata ttt act gaa	2736
Gly Ser Cys Leu Gly Val Asp Gln Ser Ala Val Ser Ile Phe Thr Glu	
900 905 910	

gag atc att cga gct gga tct gca gca gca ttg tcg tca ctt gtt aac Glu Ile Ile Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ala Leu Ser Ser Leu Val Asn 915 920 925	2784
cga ctt gac cca gtt ctt agg aag act gct aac ttg gga agt tgg cag Arg Leu Asp Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp Gln 930 935 940	2832
gtt att agt cct gta gag gtc gtc gga tat gtc att gtt gtg gac gaa Val Ile Ser Pro Val Glu Val Val Gly Tyr Val Ile Val Val Asp Glu 945 950 955 960	2880
ttg ctc act gta cag aat aaa acc tac gat aga cct aca att ata gtt Leu Leu Thr Val Gln Asn Lys Thr Tyr Asp Arg Pro Thr Ile Ile Val 965 970 975	2928
gca aac aga gtg aga gga gag gag gaa atc cct gat ggt gca gtt gcg Ala Asn Arg Val Arg Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Ala Val Ala 980 985 990	2976
gta ctg aca cct gac atg ccg gat gta cta tct cat gtt tct gtt cga Val Leu Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg 995 1000 1005	3024
gca aga aat gga aag atc tgc ttt gcc aca tgt ttt gat tct ggt Ala Arg Asn Gly Lys Ile Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Ser Gly 1010 1015 1020	3069
atc tta tct gac ctc caa gga aaa gat gga aaa ctg ttg agc cta Ile Leu Ser Asp Leu Gln Gly Lys Asp Gly Lys Leu Leu Ser Leu 1025 1030 1035	3114
caa cca acc tct gca gat gta gtc tat aaa gag gta aac gat agt Gln Pro Thr Ser Ala Asp Val Val Tyr Lys Glu Val Asn Asp Ser 1040 1045 1050	3159
gag ctt tcg agt cca agt tca gac aac ctg gaa gat gcc cct cca Glu Leu Ser Ser Pro Ser Ser Asp Asn Leu Glu Asp Ala Pro Pro 1055 1060 1065	3204
agt att tct ttg gtc aag aaa cag ttt gcg ggt aga tat gct ata Ser Ile Ser Leu Val Lys Lys Gln Phe Ala Gly Arg Tyr Ala Ile 1070 1075 1080	3249
tca tct gag gag ttc aca agt gac ttg gtt ggt gct aaa tca aga Ser Ser Glu Glu Phe Thr Ser Asp Leu Val Gly Ala Lys Ser Arg 1085 1090 1095	3294
aat atc ggg tat ctg aaa gga aaa gtt cct tct tgg gtt ggt atc Asn Ile Gly Tyr Leu Lys Gly Lys Val Pro Ser Trp Val Gly Ile 1100 1105 1110	3339
cca act tca gtt gcg ttg cca ttt ggt gtt ttt gag aag gtt atc Pro Thr Ser Val Ala Leu Pro Phe Gly Val Phe Glu Lys Val Ile 1115 1120 1125	3384
tcc gaa aag gcg aat cag gcg gtg aac gat aaa ttg cta gta ttg	3429

Ser	Glu	Lys	Ala	Asn	Gln	Ala	Val	Asn	Asp	Lys	Leu	Leu	Val	Leu	
1130						1135					1140				
aag	aaa	act	ctt	gat	gag	gga	gac	caa	ggt	gct	ctg	aag	gaa	atc	3474
Lys	Lys	Thr	Leu	Asp	Glu	Gly	Asp	Gln	Gly	Ala	Leu	Lys	Glu	Ile	
1145						1150					1155				
cgg	cag	aca	ctg	ttg	ggg	cta	gtt	gca	ccc	cca	gaa	ctg	ggt	gaa	3519
Arg	Gln	Thr	Leu	Leu	Gly	Leu	Val	Ala	Pro	Pro	Glu	Leu	Val	Glu	
1160						1165					1170				
gaa	ctg	aaa	agt	act	atg	aaa	agt	tct	gac	atg	cca	tgg	ccg	ggt	3564
Glu	Leu	Lys	Ser	Thr	Met	Lys	Ser	Ser	Asp	Met	Pro	Trp	Pro	Gly	
1175						1180					1185				
gat	gaa	ggt	gaa	cag	aga	tgg	gag	caa	gct	tgg	gca	gcc	att	aaa	3609
Asp	Glu	Gly	Glu	Gln	Arg	Trp	Glu	Gln	Ala	Trp	Ala	Ala	Ile	Lys	
1190						1195					1200				
aag	gtc	tgg	gct	tcg	aaa	tgg	aac	gag	aga	gca	tac	ttc	agc	acg	3654
Lys	Val	Trp	Ala	Ser	Lys	Trp	Asn	Glu	Arg	Ala	Tyr	Phe	Ser	Thr	
1205						1210					1215				
agg	aaa	gta	aaa	ctg	gat	cat	gac	tat	ctc	tgc	atg	gct	ggt	ttg	3699
Arg	Lys	Val	Lys	Leu	Asp	His	Asp	Tyr	Leu	Cys	Met	Ala	Val	Leu	
1220						1225					1230				
gtc	caa	gaa	gtc	atc	aat	gcg	gat	tac	gca	ttc	gtc	att	cac	aca	3744
Val	Gln	Glu	Val	Ile	Asn	Ala	Asp	Tyr	Ala	Phe	Val	Ile	His	Thr	
1235						1240					1245				
act	aat	cca	tct	tct	gga	gat	tca	tca	gag	att	tat	gcc	gag	gtg	3789
Thr	Asn	Pro	Ser	Ser	Gly	Asp	Ser	Ser	Glu	Ile	Tyr	Ala	Glu	Val	
1250						1255					1260				
gtc	aaa	ggc	ctt	ggg	gaa	act	ctt	gta	gga	gca	tat	ccc	ggt	cgg	3834
Val	Lys	Gly	Leu	Gly	Glu	Thr	Leu	Val	Gly	Ala	Tyr	Pro	Gly	Arg	
1265						1270					1275				
tct	ctg	agt	ttc	atc	tgc	aag	aaa	aac	aac	ctt	gat	tcg	cct	ctg	3879
Ser	Leu	Ser	Phe	Ile	Cys	Lys	Lys	Asn	Asn	Leu	Asp	Ser	Pro	Leu	
1280						1285					1290				
gtg	ttg	ggc	tac	cca	agc	aaa	ccg	att	ggg	ctg	ttc	ata	aga	cgt	3924
Val	Leu	Gly	Tyr	Pro	Ser	Lys	Pro	Ile	Gly	Leu	Phe	Ile	Arg	Arg	
1295						1300					1305				
tca	atc	atc	ttc	aga	tct	gat	tcc	aat	gga	gaa	gat	ctt	gaa	ggt	3969
Ser	Ile	Ile	Phe	Arg	Ser	Asp	Ser	Asn	Gly	Glu	Asp	Leu	Glu	Gly	
1310						1315					1320				
tat	gca	ggt	gca	ggc	ctc	tac	gac	agt	gta	cca	atg	gac	gag	gaa	4014
Tyr	Ala	Gly	Ala	Gly	Leu	Tyr	Asp	Ser	Val	Pro	Met	Asp	Glu	Glu	
1325						1330					1335				
gac	caa	gtc	gtg	ctc	gat	tac	aca	aca	gat	cct	ctg	atc	act	gac	4059
Asp	Gln	Val	Val	Leu	Asp	Tyr	Thr	Thr	Asp	Pro	Leu	Ile	Thr	Asp	

Lys Glu Asn Trp Val Leu Pro Ser Arg Ser Pro Asp Arg Thr Gln Asn
130 135 140

Phe Lys Asn Ser Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Lys Ser Gly Gly Asn
145 150 155 160

Ser His Leu Lys Leu Glu Ile Asp Asp Pro Ala Ile His Ala Ile Glu
165 170 175

Phe Leu Ile Phe Asp Glu Ser Arg Asn Lys Trp Tyr Lys Asn Asn Gly
180 185 190

Gln Asn Phe His Ile Asn Leu Pro Thr Glu Arg Asn Val Lys Gln Asn
195 200 205

Val Ser Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Ile Gln Ala Tyr Leu Arg Trp
210 215 220

Glu Arg Lys Gly Lys Gln Met Tyr Asn Pro Glu Lys Glu Lys Glu Glu
225 230 235 240

Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Glu Leu Arg Glu Glu Met Met Arg Gly Ala
245 250 255

Ser Val Glu Asp Leu Arg Ala Lys Leu Leu Lys Lys Asp Asn Ser Asn
260 265 270

Glu Ser Pro Lys Ser Asn Gly Thr Ser Ser Ser Gly Arg Glu Glu Lys
275 280 285

Lys Lys Val Ser Lys Gln Pro Glu Arg Lys Lys Asn Tyr Asn Thr Asp
290 295 300

Lys Ile Gln Arg Lys Gly Arg Asp Leu Thr Lys Leu Ile Tyr Lys His
305 310 315 320

Val Ala Asp Phe Val Glu Pro Glu Ser Lys Ser Ser Ser Glu Pro Arg
325 330 335

Ser Leu Thr Thr Leu Glu Ile Tyr Ala Lys Ala Lys Glu Glu Gln Glu
340 345 350

Thr Thr Pro Val Phe Ser Lys Lys Thr Phe Lys Leu Glu Gly Ser Ala
 355 360 365

Ile Leu Val Phe Val Thr Lys Leu Ser Gly Lys Thr Lys Ile His Val
 370 375 380

Ala Thr Asp Phe Lys Glu Pro Val Thr Leu His Trp Ala Leu Ser Gln
 385 390 395 400

Lys Gly Gly Glu Trp Leu Asp Pro Pro Ser Asp Ile Leu Pro Pro Asn
 405 410 415

Ser Leu Pro Val Arg Gly Ala Val Asp Thr Lys Leu Thr Ile Thr Ser
 420 425 430

Thr Asp Leu Pro Ser Pro Val Gln Thr Phe Glu Leu Glu Ile Glu Gly
 435 440 445

Asp Ser Tyr Lys Gly Met Pro Phe Val Leu Asn Ala Gly Glu Arg Trp
 450 455 460

Ile Lys Asn Asn Asp Ser Asp Phe Tyr Val Asp Phe Ala Lys Glu Glu
 465 470 475 480

Lys His Val Gln Lys Asp Tyr Gly Asp Gly Lys Gly Thr Ala Lys His
 485 490 495

Leu Leu Asp Lys Ile Ala Asp Leu Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser Phe
 500 505 510

Met His Arg Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Val Asp Glu Ala Lys Ser
 515 520 525

Ala Gly Gln Leu Gly Phe Ala Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe Met
 530 535 540

Ala Thr Arg Gln Leu Val Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg
 545 550 555 560

Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asp Val
 565 570 575

Tyr Ala Ser Tyr Pro Glu Tyr Arg Glu Leu Leu Arg Met Ile Met Ser

580					585					590					
Thr	Val	Gly	Arg	Gly	Gly	Glu	Gly	Asp	Val	Gly	Gln	Arg	Ile	Arg	Asp
	595						600					605			
Glu	Ile	Leu	Val	Ile	Gln	Arg	Lys	Asn	Asp	Cys	Lys	Gly	Gly	Ile	Met
	610					615					620				
Glu	Glu	Trp	His	Gln	Lys	Leu	His	Asn	Asn	Thr	Ser	Pro	Asp	Asp	Val
625					630					635					640
Val	Ile	Cys	Gln	Ala	Leu	Met	Asp	Tyr	Ile	Lys	Ser	Asp	Phe	Asp	Leu
			645						650					655	
Ser	Val	Tyr	Trp	Lys	Thr	Leu	Asn	Asp	Asn	Gly	Ile	Thr	Lys	Glu	Arg
		660						665					670		
Leu	Leu	Ser	Tyr	Asp	Arg	Ala	Ile	His	Ser	Glu	Pro	Asn	Phe	Arg	Gly
	675						680					685			
Glu	Gln	Lys	Asp	Gly	Leu	Leu	Arg	Asp	Leu	Gly	His	Tyr	Met	Arg	Thr
	690					695					700				
Leu	Lys	Ala	Val	His	Ser	Gly	Ala	Asp	Leu	Glu	Ser	Ala	Ile	Gln	Asn
705					710					715					720
Cys	Met	Gly	Tyr	Gln	Asp	Asp	Gly	Glu	Gly	Phe	Met	Val	Gly	Val	Gln
				725					730					735	
Ile	Asn	Pro	Val	Ser	Gly	Leu	Pro	Ser	Gly	Tyr	Pro	Asp	Leu	Leu	Arg
			740					745					750		
Phe	Val	Leu	Glu	His	Val	Glu	Glu	Lys	Asn	Val	Glu	Pro	Leu	Leu	Glu
		755					760					765			
Gly	Leu	Leu	Glu	Ala	Arg	Gln	Glu	Leu	Arg	Pro	Leu	Leu	Leu	Lys	Ser
	770					775					780				
His	Asp	Arg	Leu	Lys	Asp	Leu	Leu	Phe	Leu	Asp	Leu	Ala	Leu	Asp	Ser
785					790					795					800
Thr	Val	Arg	Thr	Ala	Ile	Glu	Arg	Gly	Tyr	Glu	Gln	Leu	Asn	Asp	Ala
				805					810					815	

Gly Pro Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu
820 825 830

Ala Leu Ser Ser Asp Asp Asn Glu Asp Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Gly
835 840 845

Trp Gln Phe Ala Leu Asp Met Cys Lys Ser Lys Lys Asp His Trp Ala
850 855 860

Leu Tyr Ala Lys Ser Val Leu Asp Arg Ser Arg Leu Ala Leu Ala Ser
865 870 875 880

Lys Ala Glu Arg Tyr Leu Glu Ile Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu
885 890 895

Gly Ser Cys Leu Gly Val Asp Gln Ser Ala Val Ser Ile Phe Thr Glu
900 905 910

Glu Ile Ile Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ala Leu Ser Ser Leu Val Asn
915 920 925

Arg Leu Asp Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp Gln
930 935 940

Val Ile Ser Pro Val Glu Val Val Gly Tyr Val Ile Val Val Asp Glu
945 950 955 960

Leu Leu Thr Val Gln Asn Lys Thr Tyr Asp Arg Pro Thr Ile Ile Val
965 970 975

Ala Asn Arg Val Arg Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Ala Val Ala
980 985 990

Val Leu Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg
995 1000 1005

Ala Arg Asn Gly Lys Ile Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Ser Gly
1010 1015 1020

Ile Leu Ser Asp Leu Gln Gly Lys Asp Gly Lys Leu Leu Ser Leu
1025 1030 1035

Gln Pro Thr Ser Ala Asp Val Val Tyr Lys Glu Val Asn Asp Ser
1040 1045 1050

Glu Leu Ser Ser Pro Ser Ser Asp Asn Leu Glu Asp Ala Pro Pro
1055 1060 1065

Ser Ile Ser Leu Val Lys Lys Gln Phe Ala Gly Arg Tyr Ala Ile
1070 1075 1080

Ser Ser Glu Glu Phe Thr Ser Asp Leu Val Gly Ala Lys Ser Arg
1085 1090 1095

Asn Ile Gly Tyr Leu Lys Gly Lys Val Pro Ser Trp Val Gly Ile
1100 1105 1110

Pro Thr Ser Val Ala Leu Pro Phe Gly Val Phe Glu Lys Val Ile
1115 1120 1125

Ser Glu Lys Ala Asn Gln Ala Val Asn Asp Lys Leu Leu Val Leu
1130 1135 1140

Lys Lys Thr Leu Asp Glu Gly Asp Gln Gly Ala Leu Lys Glu Ile
1145 1150 1155

Arg Gln Thr Leu Leu Gly Leu Val Ala Pro Pro Glu Leu Val Glu
1160 1165 1170

Glu Leu Lys Ser Thr Met Lys Ser Ser Asp Met Pro Trp Pro Gly
1175 1180 1185

Asp Glu Gly Glu Gln Arg Trp Glu Gln Ala Trp Ala Ala Ile Lys
1190 1195 1200

Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser Thr
1205 1210 1215

Arg Lys Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Cys Met Ala Val Leu
1220 1225 1230

Val Gln Glu Val Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr
1235 1240 1245

Thr Asn Pro Ser Ser Gly Asp Ser Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val
1250 1255 1260

Val Lys Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg
1265 1270 1275

Ser Leu Ser Phe Ile Cys Lys Lys Asn Asn Leu Asp Ser Pro Leu
1280 1285 1290

Val Leu Gly Tyr Pro Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Arg Arg
1295 1300 1305

Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly
1310 1315 1320

Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Glu
1325 1330 1335

Asp Gln Val Val Leu Asp Tyr Thr Thr Asp Pro Leu Ile Thr Asp
1340 1345 1350

Leu Ser Phe Gln Lys Lys Val Leu Ser Asp Ile Ala Arg Ala Gly
1355 1360 1365

Asp Ala Ile Glu Lys Leu Tyr Gly Thr Ala Gln Asp Ile Glu Gly
1370 1375 1380

Val Ile Arg Asp Gly Lys Leu Tyr Val Val Gln Thr Arg Pro Gln
1385 1390 1395

Val

<210> 10
<211> 4851
<212> DNA
<213> Solanum tuberosum

<220>
<221> CDS
<222> (105)..(4499)
<223>

<300>
<308> EMBL / Y09533

<309> 1998-07-30

<400> 10

catcttcac	gaatttctcg	aagcttcttc	gctaatttcc	tggtttcttc	actcaaaatc	60
gacgtttcta gctgaacttg agtgaattaa gccagtggga ggat atg agt aat tcc						116
Met Ser Asn Ser						
1						
tta ggg aat aac ttg ctg tac cag gga ttc cta acc tca aca gtg ttg						164
Leu Gly Asn Asn Leu Leu Tyr Gln Gly Phe Leu Thr Ser Thr Val Leu						
5	10	15	20			
gaa cat aaa agt aga atc agt cct cct tgt gtt gga ggc aat tct ttg						212
Glu His Lys Ser Arg Ile Ser Pro Pro Cys Val Gly Gly Asn Ser Leu						
25	30	35				
ttt caa caa caa gtg atc tcg aaa tca cct tta tca act gag ttt cga						260
Phe Gln Gln Gln Val Ile Ser Lys Ser Pro Leu Ser Thr Glu Phe Arg						
40	45	50				
ggg aac agg tta aag gtg cag aaa aag aaa ata cct atg gaa aag aag						308
Gly Asn Arg Leu Lys Val Gln Lys Lys Lys Ile Pro Met Glu Lys Lys						
55	60	65				
cgt gct ttt tct agt tct cct cat gct gta ctt acc act gat acc tct						356
Arg Ala Phe Ser Ser Ser Pro His Ala Val Leu Thr Thr Asp Thr Ser						
70	75	80				
tct gag cta gca gaa aag ttc agt cta ggg ggg aat att gag cta cag						404
Ser Glu Leu Ala Glu Lys Phe Ser Leu Gly Gly Asn Ile Glu Leu Gln						
85	90	95	100			
gtt gat gtt agg cct ccc act tca ggt gat gtg tcc ttt gtg gat ttt						452
Val Asp Val Arg Pro Pro Thr Ser Gly Asp Val Ser Phe Val Asp Phe						
105	110	115				
caa gta aca aat ggt agt gat aaa ctg ttt ttg cac tgg ggg gca gta						500
Gln Val Thr Asn Gly Ser Asp Lys Leu Phe Leu His Trp Gly Ala Val						
120	125	130				
aaa ttc ggg aaa gaa aca tgg tct ctt ccg aat gat cgt cca gat ggg						548
Lys Phe Gly Lys Glu Thr Trp Ser Leu Pro Asn Asp Arg Pro Asp Gly						
135	140	145				
acc aaa gtg tac aag aac aaa gca ctt aga act cca ttt gtt aaa tct						596
Thr Lys Val Tyr Lys Asn Lys Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Lys Ser						
150	155	160				
ggc tct aac tcc atc ctg aga ctg gag ata cga gac act gct atc gaa						644
Gly Ser Asn Ser Ile Leu Arg Leu Glu Ile Arg Asp Thr Ala Ile Glu						
165	170	175	180			
gct att gag ttt ctc ata tac gat gaa gcc cac gat aaa tgg ata aag						692
Ala Ile Glu Phe Leu Ile Tyr Asp Glu Ala His Asp Lys Trp Ile Lys						
185	190	195				

aat aat ggt ggt aat ttt cgt gtc aaa ttg tca aga aaa gag ata cga Asn Asn Gly Gly Asn Phe Arg Val Lys Leu Ser Arg Lys Glu Ile Arg 200 205 210	740
ggc cca gat gtt tct gtt cct gag gag ctt gta cag atc caa tca tat Gly Pro Asp Val Ser Val Pro Glu Glu Leu Val Gln Ile Gln Ser Tyr 215 220 225	788
ttg agg tgg gag agg aag gga aaa cag aat tac ccc cct gag aaa gag Leu Arg Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Glu 230 235 240	836
aag gag gaa tat gag gct gct cga act gtg cta cag gag gaa ata gct Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Val Leu Gln Glu Glu Ile Ala 245 250 255 260	884
cgt ggt gct tcc ata cag gac att cga gca agg cta aca aaa act aat Arg Gly Ala Ser Ile Gln Asp Ile Arg Ala Arg Leu Thr Lys Thr Asn 265 270 275	932
gat aaa agt caa agc aaa gaa gag cct ctt cat gta aca aag agt gat Asp Lys Ser Gln Ser Lys Glu Glu Pro Leu His Val Thr Lys Ser Asp 280 285 290	980
ata cct gat gac ctt gcc caa gca caa gct tac att agg tgg gag aaa Ile Pro Asp Asp Leu Ala Gln Ala Gln Ala Tyr Ile Arg Trp Glu Lys 295 300 305	1028
gca gga aag ccg aac tat cct cca gaa aag caa att gaa gaa ctc gaa Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Gln Ile Glu Glu Leu Glu 310 315 320	1076
gaa gca aga aga gaa ttg caa ctt gag ctt gag aaa ggc att acc ctt Glu Ala Arg Arg Glu Leu Gln Leu Glu Leu Glu Lys Gly Ile Thr Leu 325 330 335 340	1124
gat gag ttg cgg aaa acg att aca aaa ggg gag ata aaa act aag gtg Asp Glu Leu Arg Lys Thr Ile Thr Lys Gly Glu Ile Lys Thr Lys Val 345 350 355	1172
gaa aag cac ctg aaa aga agt tct ttt gcc gtt gaa aga atc caa aga Glu Lys His Leu Lys Arg Ser Ser Phe Ala Val Glu Arg Ile Gln Arg 360 365 370	1220
aag aag aga gac ttt ggg cat ctt att aat aag tat act tcc agt cct Lys Lys Arg Asp Phe Gly His Leu Ile Asn Lys Tyr Thr Ser Ser Pro 375 380 385	1268
gca gta caa gta caa aag gtc ttg gaa gaa cca cca gcc tta tct aaa Ala Val Gln Val Gln Lys Val Leu Glu Glu Pro Pro Ala Leu Ser Lys 390 395 400	1316
att aag ctg tat gcc aag gag aag gag gag cag att gat gat ccg atc Ile Lys Leu Tyr Ala Lys Glu Lys Glu Glu Gln Ile Asp Asp Pro Ile 405 410 415 420	1364
cta aat aaa aag atc ttt aag gtc gat gat ggg gag cta ctg gta ctg	1412

Leu Asn Lys Lys Ile Phe Lys Val Asp Asp Gly Glu Leu Leu Val Leu	
425 430 435	
gta gca aag tcc tct ggg aag aca aaa gta cat cta gct aca gat ctg	1460
Val Ala Lys Ser Ser Gly Lys Thr Lys Val His Leu Ala Thr Asp Leu	
440 445 450	
aat cag cca att act ctt cac tgg gca tta tcc aaa agt cct gga gag	1508
Asn Gln Pro Ile Thr Leu His Trp Ala Leu Ser Lys Ser Pro Gly Glu	
455 460 465	
tgg atg gta cca cct tca agc ata ttg cct cct ggg tca att att tta	1556
Trp Met Val Pro Pro Ser Ser Ile Leu Pro Pro Gly Ser Ile Ile Leu	
470 475 480	
gac aag gct gcc gaa aca cct ttt tca gcc agt tct tct gat ggt cta	1604
Asp Lys Ala Ala Glu Thr Pro Phe Ser Ala Ser Ser Ser Asp Gly Leu	
485 490 495 500	
act tct aag gta caa tct ttg gat ata gta att gaa gat ggc aat ttt	1652
Thr Ser Lys Val Gln Ser Leu Asp Ile Val Ile Glu Asp Gly Asn Phe	
505 510 515	
gtg ggg atg cca ttt gtt ctt ttg tct ggt gaa aaa tgg att aag aac	1700
Val Gly Met Pro Phe Val Leu Leu Ser Gly Glu Lys Trp Ile Lys Asn	
520 525 530	
caa ggg tcg gat ttc tat gtt ggc ttc agt gct gca tcc aaa tta gca	1748
Gln Gly Ser Asp Phe Tyr Val Gly Phe Ser Ala Ala Ser Lys Leu Ala	
535 540 545	
ctc aag gct gct ggg gat ggc agt gga act gca aag tct tta ctg gat	1796
Leu Lys Ala Ala Gly Asp Gly Ser Gly Thr Ala Lys Ser Leu Leu Asp	
550 555 560	
aaa ata gca gat atg gaa agt gag gct cag aag tca ttt atg cac cgg	1844
Lys Ile Ala Asp Met Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser Phe Met His Arg	
565 570 575 580	
ttt aat att gca gct gac ttg ata gaa gat gcc act agt gct ggt gaa	1892
Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Ile Glu Asp Ala Thr Ser Ala Gly Glu	
585 590 595	
ctt ggt ttt gct gga att ctt gta tgg atg agg ttc atg gct aca agg	1940
Leu Gly Phe Ala Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe Met Ala Thr Arg	
600 605 610	
caa ctg ata tgg aac aaa aac tat aac gta aaa cca cgt gaa ata agc	1988
Gln Leu Ile Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser	
615 620 625	
aag gct cag gac aga ctt aca gac ttg ttg cag aat gct ttc acc agt	2036
Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asn Ala Phe Thr Ser	
630 635 640	
cac cct cag tac cgt gaa att ttg cgg atg att atg tca act gtt gga	2084
His Pro Gln Tyr Arg Glu Ile Leu Arg Met Ile Met Ser Thr Val Gly	

645	650	655	660	
cgt gga ggt gaa ggg gat gta gga cag cga att agg gat gaa att ttg Arg Gly Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu 665 670 675				2132
gtc atc cag agg aac aat gac tgc aag ggt ggt atg atg caa gaa tgg Val Ile Gln Arg Asn Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met Met Gln Glu Trp 680 685 690				2180
cat cag aaa ttg cat aat aat act agt cct gat gat gtt gtg atc tgt His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val Val Ile Cys 695 700 705				2228
cag gca tta att gac tac atc aag agt gat ttt gat ctt ggt gtt tat Gln Ala Leu Ile Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Leu Gly Val Tyr 710 715 720				2276
tgg aaa acc ctg aat gag aac gga ata aca aaa gag cgt ctt ttg agt Trp Lys Thr Leu Asn Glu Asn Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser 725 730 735 740				2324
tat gac cgt gct atc cat tct gaa cca aat ttt aga gga gat caa aag Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Gly Asp Gln Lys 745 750 755				2372
ggg ggt ctt ttg cgt gat tta ggt cac tat atg aga aca ttg aag gca Gly Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly His Tyr Met Arg Thr Leu Lys Ala 760 765 770				2420
gtt cat tca ggt gca gat ctt gag tct gct att gca aac tgc atg ggc Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ala Asn Cys Met Gly 775 780 785				2468
tac aaa act gag gga gaa ggc ttt atg gtt gga gtc cag ata aat cct Tyr Lys Thr Glu Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val Gln Ile Asn Pro 790 795 800				2516
gta tca ggc ttg cca tct ggc ttt cag gac ctc ctc cat ttt gtc tta Val Ser Gly Leu Pro Ser Gly Phe Gln Asp Leu Leu His Phe Val Leu 805 810 815 820				2564
gac cat gtg gaa gat aaa aat gtg gaa act ctt ctt gag aga ttg cta Asp His Val Glu Asp Lys Asn Val Glu Thr Leu Leu Glu Arg Leu Leu 825 830 835				2612
gag gct cgt gag gag ctt agg ccc ttg ctt ctc aaa cca aac aac cgt Glu Ala Arg Glu Glu Leu Arg Pro Leu Leu Leu Lys Pro Asn Asn Arg 840 845 850				2660
cta aag gat ctg ctg ttt ttg gac ata gca ctt gat tct aca gtt aga Leu Lys Asp Leu Leu Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp Ser Thr Val Arg 855 860 865				2708
aca gca gta gaa agg gga tat gaa gaa ttg aac aac gct aat cct gag Thr Ala Val Glu Arg Gly Tyr Glu Glu Leu Asn Asn Ala Asn Pro Glu 870 875 880				2756

aaa Lys 885	atc Ile	atg Met	tac Tyr	ttc Phe	atc Ile 890	tcc Ser	ctc Leu	gtt Val	ctt Leu	gaa Glu 895	aat Asn	ctc Leu	gca Ala	ctc Leu	tct Ser 900	2804
gtg Val	gac Asp	gat Asp	aat Asn	gaa Glu 905	gat Asp	ctt Leu	gtt Val	tat Tyr	tgc Cys 910	ttg Leu	aag Lys	gga Gly	tgg Trp	aat Asn	caa Gln	2852
gct Ala	ctt Leu	tca Ser	atg Met 920	tcc Ser	aat Asn	ggg Gly	ggg Gly	gac Asp 925	aac Asn	cat His	tgg Trp	gct Ala	tta Leu	ttt Phe	gca Ala	2900
aaa Lys	gct Ala	gtg Val	ctt Leu 935	gac Asp	aga Arg	acc Thr	cgt Arg 940	ctt Leu	gca Ala	ctt Leu	gca Ala	agc Ser 945	aag Lys	gca Ala	gag Glu	2948
tgg Trp	tac Tyr 950	cat His	cac His	tta Leu	ttg Leu	cag Gln 955	cca Pro	tct Ser	gcc Ala	gaa Glu	tat Tyr 960	cta Leu	gga Gly	tca Ser	ata Ile	2996
ctt Leu 965	ggg Gly	gtg Val	gac Asp	caa Gln 970	tgg Trp	gct Ala	ttg Leu	aac Asn	ata Ile	ttt Phe 975	act Thr	gaa Glu	gaa Glu	att Ile	ata Ile 980	3044
cgt Arg	gct Ala	gga Gly	tca Ser 985	gca Ala	gct Ala	tca Ser	tta Leu	tcc Ser	tct Ser 990	ctt Leu	ctt Leu	aat Asn	aga Arg	ctc Leu 995	gat Asp	3092
ccc Pro	gtg Val	ctt Leu	cgg Arg 1000	aaa Lys	act Thr	gca Ala	aat Asn	cta Leu 1005	gga Gly	agt Ser	tgg Trp	cag Gln	att Ile 1010	atc Ile		3137
agt Ser	cca Pro	gtt Val	gaa Glu 1015	gcc Ala	gtt Val	gga Gly	tat Tyr	gtt Val 1020	gtc Val	gtt Val	gtg Val	gat Asp	gag Glu 1025	ttg Leu		3182
ctt Leu	tca Ser	gtt Val	cag Gln 1030	aat Asn	gaa Glu	atc Ile	tac Tyr	gag Glu 1035	aag Lys	ccc Pro	acg Thr	atc Ile	tta Leu 1040	gta Val		3227
gca Ala	aaa Lys	tct Ser	gtt Val 1045	aaa Lys	gga Gly	gag Glu	gag Glu	gaa Glu 1050	att Ile	cct Pro	gat Asp	ggg Gly	gct Ala 1055	gtt Val		3272
gcc Ala	ctg Leu	ata Ile	aca Thr 1060	cca Pro	gac Asp	atg Met	cca Pro	gat Asp 1065	gtt Val	ctt Leu	tca Ser	cat His	gtt Val 1070	tct Ser		3317
gtt Val	cga Arg	gct Ala	aga Arg 1075	aat Asn	ggg Gly	aag Lys	gtt Val	tgc Cys 1080	ttt Phe	gct Ala	aca Thr	tgc Cys	ttt Phe 1085	gat Asp		3362
ccc Pro	aat Asn	ata Ile	ttg Leu 1090	gct Ala	gac Asp	ctc Leu	caa Gln	gca Ala 1095	aag Lys	gaa Glu	gga Gly	agg Arg	att Ile 1100	ttg Leu		3407

ctc tta aag cct	aca cct tca gac	ata atc tat agt gag gtg aat	3452
Leu Leu Lys Pro	Thr Pro Ser Asp	Ile Ile Tyr Ser Glu Val Asn	
1105	1110	1115	
gag att gag ctc	caa agt tca agt aac	ttg gta gaa gct gaa act	3497
Glu Ile Glu Leu	Gln Ser Ser Ser Asn	Leu Val Glu Ala Glu Thr	
1120	1125	1130	
tca gca aca ctt	aga ttg gtg aaa aag	caa ttt ggt ggt tgt tac	3542
Ser Ala Thr Leu	Arg Leu Val Lys Lys	Gln Phe Gly Gly Cys Tyr	
1135	1140	1145	
gca ata tca gca	gat gaa ttc aca agt	gaa atg gtt gga gct aaa	3587
Ala Ile Ser Ala	Asp Glu Phe Thr Ser	Glu Met Val Gly Ala Lys	
1150	1155	1160	
tca cgt aat att	gca tat ctg aaa gga	aaa gtg cct tcc tcg gtg	3632
Ser Arg Asn Ile	Ala Tyr Leu Lys Gly	Lys Val Pro Ser Ser Val	
1165	1170	1175	
gga att oct acg	tca gta gct ctt cca	ttt gga gtc ttt gag aaa	3677
Gly Ile Pro Thr	Ser Val Ala Leu Pro	Phe Gly Val Phe Glu Lys	
1180	1185	1190	
gta ctt tca gac	gac ata aat cag gga	gtg gca aaa gag ttg caa	3722
Val Leu Ser Asp	Asp Ile Asn Gln Gly	Val Ala Lys Glu Leu Gln	
1195	1200	1205	
att ctg atg aaa	aaa cta tct gaa gga	gac ttc agc gct ctt ggt	3767
Ile Leu Met Lys	Lys Leu Ser Glu Gly	Asp Phe Ser Ala Leu Gly	
1210	1215	1220	
gaa att cgc aca	acg gtt tta gat ctt	tca gca cca gct caa ttg	3812
Glu Ile Arg Thr	Thr Val Leu Asp Leu	Ser Ala Pro Ala Gln Leu	
1225	1230	1235	
gtc aaa gag ctg	aag gag aag atg cag	ggg tct ggc atg cct tgg	3857
Val Lys Glu Leu	Lys Glu Lys Met Gln	Gly Ser Gly Met Pro Trp	
1240	1245	1250	
cct ggt gat gaa	ggg cca aag cgg tgg	gaa caa gca tgg atg gcc	3902
Pro Gly Asp Glu	Gly Pro Lys Arg Trp	Glu Gln Ala Trp Met Ala	
1255	1260	1265	
ata aaa aag gtg	tgg gct tca aaa tgg	aat gag aga gca tac ttc	3947
Ile Lys Lys Val	Trp Ala Ser Lys Trp	Asn Glu Arg Ala Tyr Phe	
1270	1275	1280	
agc aca agg aag	gtg aaa ctg gat cat	gac tat ctg tgc atg gct	3992
Ser Thr Arg Lys	Val Lys Leu Asp His	Asp Tyr Leu Cys Met Ala	
1285	1290	1295	
gtc ctt gtt caa	gaa ata ata aat gct	gat tat gca ttt gtc att	4037
Val Leu Val Gln	Glu Ile Ile Asn Ala	Asp Tyr Ala Phe Val Ile	
1300	1305	1310	
cac aca acc aac	cca tct tcc gga gac	gac tca gaa ata tat gcc	4082

His Thr Thr Asn Pro Ser Ser Gly Asp Asp Ser Glu Ile Tyr Ala	
1315 1320 1325	
gag gtg gtc agg ggc ctt ggg gaa aca ctt gtt gga gct tat cca	4127
Glu Val Val Arg Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro	
1330 1335 1340	
gga cgt gct ttg agt ttt atc tgc aag aaa aag gat ctc aac tct	4172
Gly Arg Ala Leu Ser Phe Ile Cys Lys Lys Lys Asp Leu Asn Ser	
1345 1350 1355	
cct caa gtg tta ggt tac cca agc aaa ccg atc ggc ctt ttc ata	4217
Pro Gln Val Leu Gly Tyr Pro Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile	
1360 1365 1370	
aaa aga tct atc atc ttc cga tct gat tcc aat ggg gaa gat ttg	4262
Lys Arg Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu	
1375 1380 1385	
gaa ggt tat gcc ggt gct ggc ctc tac gac agt gta cca atg gat	4307
Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp	
1390 1395 1400	
gag gag gaa aaa gtt gta att gat tac tct tcc gac cca ttg ata	4352
Glu Glu Glu Lys Val Val Ile Asp Tyr Ser Ser Asp Pro Leu Ile	
1405 1410 1415	
act gat ggt aac ttc cgc cag aca atc ctg tcc aac att gct cgt	4397
Thr Asp Gly Asn Phe Arg Gln Thr Ile Leu Ser Asn Ile Ala Arg	
1420 1425 1430	
gct gga cat gct atc gag gag cta tat ggc tct cct caa gac att	4442
Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser Pro Gln Asp Ile	
1435 1440 1445	
gag ggt gta gtg agg gat gga aag att tat gtc gtt cag aca aga	4487
Glu Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val Gln Thr Arg	
1450 1455 1460	
cca cag atg tga ttatatcttc gttgtatggt gttcagagaa gaccacagat	4539
Pro Gln Met	
gtgatcatat tctcattgta tcagatctgt gaccacttac ctgatacctc ccatgaagtt	4599
acctgtatga ttatacgtga tccaaagcca tcacatcatg ttcaccttca gctattggag	4659
gagaagtgag aagtaggaat tgcaatatga ggaataataa gaaaaacttt gtaaaagcta	4719
aattagctgg gtatgatata gggagaaatg tgtaaacatt gtactatata tagtatatac	4779
acacgcatta tgtattgcat tatgcactga ataatatcgc agcatcaaag aagaaatcct	4839
ttgggtggtt tc	4851

<211> 1464
<212> PRT
<213> Solanum tuberosum

<400> 11

Met Ser Asn Ser Leu Gly Asn Asn Leu Leu Tyr Gln Gly Phe Leu Thr
1 5 10 15

Ser Thr Val Leu Glu His Lys Ser Arg Ile Ser Pro Pro Cys Val Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Leu Phe Gln Gln Gln Val Ile Ser Lys Ser Pro Leu Ser
35 40 45

Thr Glu Phe Arg Gly Asn Arg Leu Lys Val Gln Lys Lys Lys Ile Pro
50 55 60

Met Glu Lys Lys Arg Ala Phe Ser Ser Ser Pro His Ala Val Leu Thr
65 70 75 80

Thr Asp Thr Ser Ser Glu Leu Ala Glu Lys Phe Ser Leu Gly Gly Asn
85 90 95

Ile Glu Leu Gln Val Asp Val Arg Pro Pro Thr Ser Gly Asp Val Ser
100 105 110

Phe Val Asp Phe Gln Val Thr Asn Gly Ser Asp Lys Leu Phe Leu His
115 120 125

Trp Gly Ala Val Lys Phe Gly Lys Glu Thr Trp Ser Leu Pro Asn Asp
130 135 140

Arg Pro Asp Gly Thr Lys Val Tyr Lys Asn Lys Ala Leu Arg Thr Pro
145 150 155 160

Phe Val Lys Ser Gly Ser Asn Ser Ile Leu Arg Leu Glu Ile Arg Asp
165 170 175

Thr Ala Ile Glu Ala Ile Glu Phe Leu Ile Tyr Asp Glu Ala His Asp
180 185 190

Lys Trp Ile Lys Asn Asn Gly Gly Asn Phe Arg Val Lys Leu Ser Arg
195 200 205

Lys Glu Ile Arg Gly Pro Asp Val Ser Val Pro Glu Glu Leu Val Gln
210 215 220

Ile Gln Ser Tyr Leu Arg Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Asn Tyr Pro
225 230 235 240

Pro Glu Lys Glu Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Val Leu Gln
245 250 255

Glu Glu Ile Ala Arg Gly Ala Ser Ile Gln Asp Ile Arg Ala Arg Leu
260 265 270

Thr Lys Thr Asn Asp Lys Ser Gln Ser Lys Glu Glu Pro Leu His Val
275 280 285

Thr Lys Ser Asp Ile Pro Asp Asp Leu Ala Gln Ala Gln Ala Tyr Ile
290 295 300

Arg Trp Glu Lys Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Gln Ile
305 310 315 320

Glu Glu Leu Glu Glu Ala Arg Arg Glu Leu Gln Leu Glu Leu Glu Lys
325 330 335

Gly Ile Thr Leu Asp Glu Leu Arg Lys Thr Ile Thr Lys Gly Glu Ile
340 345 350

Lys Thr Lys Val Glu Lys His Leu Lys Arg Ser Ser Phe Ala Val Glu
355 360 365

Arg Ile Gln Arg Lys Lys Arg Asp Phe Gly His Leu Ile Asn Lys Tyr
370 375 380

Thr Ser Ser Pro Ala Val Gln Val Gln Lys Val Leu Glu Glu Pro Pro
385 390 395 400

Ala Leu Ser Lys Ile Lys Leu Tyr Ala Lys Glu Lys Glu Glu Gln Ile
405 410 415

Asp Asp Pro Ile Leu Asn Lys Lys Ile Phe Lys Val Asp Asp Gly Glu
420 425 430

Leu Leu Val Leu Val Ala Lys Ser Ser Gly Lys Thr Lys Val His Leu
435 440 445

Ala Thr Asp Leu Asn Gln Pro Ile Thr Leu His Trp Ala Leu Ser Lys
450 455 460

Ser Pro Gly Glu Trp Met Val Pro Pro Ser Ser Ile Leu Pro Pro Gly
465 470 475 480

Ser Ile Ile Leu Asp Lys Ala Ala Glu Thr Pro Phe Ser Ala Ser Ser
485 490 495

Ser Asp Gly Leu Thr Ser Lys Val Gln Ser Leu Asp Ile Val Ile Glu
500 505 510

Asp Gly Asn Phe Val Gly Met Pro Phe Val Leu Leu Ser Gly Glu Lys
515 520 525

Trp Ile Lys Asn Gln Gly Ser Asp Phe Tyr Val Gly Phe Ser Ala Ala
530 535 540

Ser Lys Leu Ala Leu Lys Ala Ala Gly Asp Gly Ser Gly Thr Ala Lys
545 550 555 560

Ser Leu Leu Asp Lys Ile Ala Asp Met Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser
565 570 575

Phe Met His Arg Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Ile Glu Asp Ala Thr
580 585 590

Ser Ala Gly Glu Leu Gly Phe Ala Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe
595 600 605

Met Ala Thr Arg Gln Leu Ile Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro
610 615 620

Arg Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asn
625 630 635 640

Ala Phe Thr Ser His Pro Gln Tyr Arg Glu Ile Leu Arg Met Ile Met
645 650 655

Ser Thr Val Gly Arg Gly Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg

660

665

670

Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg Asn Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met
 675 680 685

Met Gln Glu Trp His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp
 690 695 700

Val Val Ile Cys Gln Ala Leu Ile Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp
 705 710 715 720

Leu Gly Val Tyr Trp Lys Thr Leu Asn Glu Asn Gly Ile Thr Lys Glu
 725 730 735

Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg
 740 745 750

Gly Asp Gln Lys Gly Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly His Tyr Met Arg
 755 760 765

Thr Leu Lys Ala Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ala
 770 775 780

Asn Cys Met Gly Tyr Lys Thr Glu Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val
 785 790 795 800

Gln Ile Asn Pro Val Ser Gly Leu Pro Ser Gly Phe Gln Asp Leu Leu
 805 810 815

His Phe Val Leu Asp His Val Glu Asp Lys Asn Val Glu Thr Leu Leu
 820 825 830

Glu Arg Leu Leu Glu Ala Arg Glu Glu Leu Arg Pro Leu Leu Leu Lys
 835 840 845

Pro Asn Asn Arg Leu Lys Asp Leu Leu Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp
 850 855 860

Ser Thr Val Arg Thr Ala Val Glu Arg Gly Tyr Glu Glu Leu Asn Asn
 865 870 875 880

Ala Asn Pro Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn
 885 890 895

Leu Ala Leu Ser Val Asp Asp Asn Glu Asp Leu Val Tyr Cys Leu Lys
 900 905 910

Gly Trp Asn Gln Ala Leu Ser Met Ser Asn Gly Gly Asp Asn His Trp
 915 920 925

Ala Leu Phe Ala Lys Ala Val Leu Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala
 930 935 940

Ser Lys Ala Glu Trp Tyr His His Leu Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr
 945 950 955 960

Leu Gly Ser Ile Leu Gly Val Asp Gln Trp Ala Leu Asn Ile Phe Thr
 965 970 975

Glu Glu Ile Ile Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Leu
 980 985 990

Asn Arg Leu Asp Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp
 995 1000 1005

Gln Ile Ile Ser Pro Val Glu Ala Val Gly Tyr Val Val Val Val
 1010 1015 1020

Asp Glu Leu Leu Ser Val Gln Asn Glu Ile Tyr Glu Lys Pro Thr
 1025 1030 1035

Ile Leu Val Ala Lys Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp
 1040 1045 1050

Gly Ala Val Ala Leu Ile Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser
 1055 1060 1065

His Val Ser Val Arg Ala Arg Asn Gly Lys Val Cys Phe Ala Thr
 1070 1075 1080

Cys Phe Asp Pro Asn Ile Leu Ala Asp Leu Gln Ala Lys Glu Gly
 1085 1090 1095

Arg Ile Leu Leu Leu Lys Pro Thr Pro Ser Asp Ile Ile Tyr Ser
 1100 1105 1110

Glu Val	Asn Glu Ile Glu Leu	Gln Ser Ser Ser Asn	Leu Val Glu
1115	1120	1125	
Ala Glu	Thr Ser Ala Thr Leu	Arg Leu Val Lys Lys	Gln Phe Gly
1130	1135	1140	
Gly Cys	Tyr Ala Ile Ser Ala	Asp Glu Phe Thr Ser	Glu Met Val
1145	1150	1155	
Gly Ala	Lys Ser Arg Asn Ile	Ala Tyr Leu Lys Gly	Lys Val Pro
1160	1165	1170	
Ser Ser	Val Gly Ile Pro Thr	Ser Val Ala Leu Pro	Phe Gly Val
1175	1180	1185	
Phe Glu	Lys Val Leu Ser Asp	Asp Ile Asn Gln Gly	Val Ala Lys
1190	1195	1200	
Glu Leu	Gln Ile Leu Met Lys	Lys Leu Ser Glu Gly	Asp Phe Ser
1205	1210	1215	
Ala Leu	Gly Glu Ile Arg Thr	Thr Val Leu Asp Leu	Ser Ala Pro
1220	1225	1230	
Ala Gln	Leu Val Lys Glu Leu	Lys Glu Lys Met Gln	Gly Ser Gly
1235	1240	1245	
Met Pro	Trp Pro Gly Asp Glu	Gly Pro Lys Arg Trp	Glu Gln Ala
1250	1255	1260	
Trp Met	Ala Ile Lys Lys Val	Trp Ala Ser Lys Trp	Asn Glu Arg
1265	1270	1275	
Ala Tyr	Phe Ser Thr Arg Lys	Val Lys Leu Asp His	Asp Tyr Leu
1280	1285	1290	
Cys Met	Ala Val Leu Val Gln	Glu Ile Ile Asn Ala	Asp Tyr Ala
1295	1300	1305	
Phe Val	Ile His Thr Thr Asn	Pro Ser Ser Gly Asp	Asp Ser Glu
1310	1315	1320	

Ile Tyr Ala Glu Val Val Arg Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly
1325 1330 1335

Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Leu Ser Phe Ile Cys Lys Lys Lys Asp
1340 1345 1350

Leu Asn Ser Pro Gln Val Leu Gly Tyr Pro Ser Lys Pro Ile Gly
1355 1360 1365

Leu Phe Ile Lys Arg Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly
1370 1375 1380

Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Val
1385 1390 1395

Pro Met Asp Glu Glu Glu Lys Val Val Ile Asp Tyr Ser Ser Asp
1400 1405 1410

Pro Leu Ile Thr Asp Gly Asn Phe Arg Gln Thr Ile Leu Ser Asn
1415 1420 1425

Ile Ala Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser Pro
1430 1435 1440

Gln Asp Ile Glu Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val
1445 1450 1455

Gln Thr Arg Pro Gln Met
1460

<210> 12
<211> 4576
<212> DNA
<213> Oryza sativa

<220>
<221> CDS
<222> (20)..(4393)
<223>

<300>
<308> NCBI / AR400814
<309> 2003-12-18

<400> 12
cttacagata ttcgtgcag atg agc gga ttc tcc gcg gca gct gct gcg gcc

Met Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala																
1				5				10								
gag cgg tgc gcg ctc ggc ctc ggc gtc cac gcg cgc ccc gcc tcg ccc																100
Glu Arg Cys Ala Leu Gly Leu Gly Val His Ala Arg Pro Ala Ser Pro																
15				20				25								
tcg ccg gcg ctg ctc ccg ccg gcg gct ctc cgc cgc gcc cgc cgt ctc																148
Ser Pro Ala Leu Leu Pro Pro Ala Ala Leu Arg Arg Gly Arg Arg Leu																
30				35				40								
ccc gcg gcc acc acc acc ctc gcc gtc tcc cgt cgg agc ctc ctc gcc																196
Pro Ala Ala Thr Thr Thr Leu Ala Val Ser Arg Arg Ser Leu Leu Ala																
45				50				55								
cct cgc gcc atc gcc gct tcc acc ggc cgc gcc tcc ccg gcc ctt gtc																244
Pro Arg Ala Ile Ala Ala Ser Thr Gly Arg Ala Ser Pro Gly Leu Val																
60				65				70				75				
gga agg ttc acc ctg gat gcc aac tcc gag ctt aag gtg aca ttg aac																292
Gly Arg Phe Thr Leu Asp Ala Asn Ser Glu Leu Lys Val Thr Leu Asn																
80				85				90								
cca gca ccg cag ggt tcg gtg gtg gag atc aat cta gag gca act aac																340
Pro Ala Pro Gln Gly Ser Val Val Glu Ile Asn Leu Glu Ala Thr Asn																
95				100				105								
acc agc gcc tcc ctg ata ctg cat tgg ggc gcc ctt cgc ccg gat aga																388
Thr Ser Gly Ser Leu Ile Leu His Trp Gly Ala Leu Arg Pro Asp Arg																
110				115				120								
gga gaa tgg ctc cta cca tcc cgg aaa cca gat ggc acg aca gtg tac																436
Gly Glu Trp Leu Leu Pro Ser Arg Lys Pro Asp Gly Thr Thr Val Tyr																
125				130				135								
aag aac agg gct ctt agg acg cct ttt ata aag tca ggt gat aac tcc																484
Lys Asn Arg Ala Leu Arg Thr Pro Phe Ile Lys Ser Gly Asp Asn Ser																
140				145				150				155				
acg ctg aaa att gag ata gat gat cct gca gtg caa gcc att gag ttc																532
Thr Leu Lys Ile Glu Ile Asp Asp Pro Ala Val Gln Ala Ile Glu Phe																
160				165				170								
ctc ata ttt gat gag gca cgg aat aat tgg tac aaa aac aat ggc cag																580
Leu Ile Phe Asp Glu Ala Arg Asn Asn Trp Tyr Lys Asn Asn Gly Gln																
175				180				185								
aat ttc caa att cag cta caa gcg agc caa tat caa ggg cag ggt aca																628
Asn Phe Gln Ile Gln Leu Gln Ala Ser Gln Tyr Gln Gly Gln Gly Thr																
190				195				200								
tct act gct act tct tct act gtg gtt cca gag gat ctt gtg cag ata																676
Ser Thr Ala Thr Ser Ser Thr Val Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Ile																
205				210				215								
caa tca tat ctt cgg tgg gaa aga aag gga aag cag tca tat aca cct																724
Gln Ser Tyr Leu Arg Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Ser Tyr Thr Pro																

220	225	230	235	
gag caa gag aag gag gag tat gaa gca gca cga act gag ttg ata gag Glu Gln Glu Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Glu Leu Ile Glu 240 245 250				772
gaa tta aac aag ggt gtt tct ttg gag aag cta cga gcg aaa ctg aca Glu Leu Asn Lys Gly Val Ser Leu Glu Lys Leu Arg Ala Lys Leu Thr 255 260 265				820
aag aca cct gag gca act gat agt aat gct cct gca tct gaa agc act Lys Thr Pro Glu Ala Thr Asp Ser Asn Ala Pro Ala Ser Glu Ser Thr 270 275 280				868
gtg act act aaa gtc cca gag gaa ctt gta caa gtc cag gct tac ata Val Thr Thr Lys Val Pro Glu Glu Leu Val Gln Val Gln Ala Tyr Ile 285 290 295				916
agg tgg gag aaa gca ggc aag cca aat tat gcc cca gag aag caa ttg Arg Trp Glu Lys Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Ala Pro Glu Lys Gln Leu 300 305 310 315				964
gtc gag ttt gag gaa gca agg aag gaa ctg cag tct gag ttg gat aag Val Glu Phe Glu Glu Ala Arg Lys Glu Leu Gln Ser Glu Leu Asp Lys 320 325 330				1012
ggg acc tca gtt gag cag ttg agg aac aaa att ttg aaa ggg aac att Gly Thr Ser Val Glu Gln Leu Arg Asn Lys Ile Leu Lys Gly Asn Ile 335 340 345				1060
gag aca aaa gtt tcc aag cag ctg aag gac aaa aaa tac ttt tct gtg Glu Thr Lys Val Ser Lys Gln Leu Lys Asp Lys Lys Tyr Phe Ser Val 350 355 360				1108
gaa aga att cag cgg aaa aaa cga gat att gtg caa cta ctt aaa aaa Glu Arg Ile Gln Arg Lys Lys Arg Asp Ile Val Gln Leu Leu Lys Lys 365 370 375				1156
cac aag cct act gtt atg gaa gcg caa gta gag act cct aaa caa ccc His Lys Pro Thr Val Met Glu Ala Gln Val Glu Thr Pro Lys Gln Pro 380 385 390 395				1204
act gtt ctg gat ctc ttc aca aag tca tta cag gag cag gat aac tgt Thr Val Leu Asp Leu Phe Thr Lys Ser Leu Gln Glu Gln Asp Asn Cys 400 405 410				1252
gag gtt cta agc aga aag ctt ttc aag ttc ggt gac aag gag ata ctg Glu Val Leu Ser Arg Lys Leu Phe Lys Phe Gly Asp Lys Glu Ile Leu 415 420 425				1300
gga att acc acc gtt gct cta gga aaa acc aaa gtt cac ttg gca aca Gly Ile Thr Thr Val Ala Leu Gly Lys Thr Lys Val His Leu Ala Thr 430 435 440				1348
aac tat atg gag cca ctt ata ctt cac tgg gcg ttg tca aaa gag aat Asn Tyr Met Glu Pro Leu Ile Leu His Trp Ala Leu Ser Lys Glu Asn 445 450 455				1396

gga gag tgg cag gca cct ccc tca agc ata ttg cca tct ggt tca tca Gly Glu Trp Gln Ala Pro Pro Ser Ser Ile Leu Pro Ser Gly Ser Ser 460 465 470 475	1444
ttg cta gac aag gca tgt gaa act tca ttc agt gaa tat gaa ttg aat Leu Leu Asp Lys Ala Cys Glu Thr Ser Phe Ser Glu Tyr Glu Leu Asn 480 485 490	1492
ggt ctg cat tgt cag gtt gtt gag atc gag ctt gac gat ggt gga tac Gly Leu His Cys Gln Val Val Glu Ile Glu Leu Asp Asp Gly Gly Tyr 495 500 505	1540
aag cgg atg ccc ttt gtt ctc cgg tct ggt gaa aca tgg atg aaa aat Lys Arg Met Pro Phe Val Leu Arg Ser Gly Glu Thr Trp Met Lys Asn 510 515 520	1588
aat ggc tct gac ttt tac ttg gat ttc agc acc aaa gtt gca aaa aat Asn Gly Ser Asp Phe Tyr Leu Asp Phe Ser Thr Lys Val Ala Lys Asn 525 530 535	1636
aca aag gat act ggt gat gct ggt aaa ggc act gct gag gcc ttg ctt Thr Lys Asp Thr Gly Asp Ala Gly Lys Gly Thr Ala Glu Ala Leu Leu 540 545 550 555	1684
gaa aga ata gca gat cta gag gaa gat gcc caa cga tct ctt atg cac Glu Arg Ile Ala Asp Leu Glu Glu Asp Ala Gln Arg Ser Leu Met His 560 565 570	1732
aga ttc aat att gca gca gat cta gtt gac caa gcg aga gat aat gga Arg Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Val Asp Gln Ala Arg Asp Asn Gly 575 580 585	1780
tta ttg ggt att att gga att ttt gtt tgg att ggg ttc atg gct aca Leu Leu Gly Ile Ile Gly Ile Phe Val Trp Ile Gly Phe Met Ala Thr 590 595 600	1828
agg caa cta ata tgg aac aag aac tac aat gtg aag cca cgt gag ata Arg Gln Leu Ile Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile 605 610 615	1876
agc aaa gcc caa gat agg ttt aca gat gat ctt gag aat atg tac aga Ser Lys Ala Gln Asp Arg Phe Thr Asp Asp Leu Glu Asn Met Tyr Arg 620 625 630 635	1924
act tac cca caa tat cag gag atc tta aga atg ata atg tct gct gtt Thr Tyr Pro Gln Tyr Gln Glu Ile Leu Arg Met Ile Met Ser Ala Val 640 645 650	1972
ggt cgg gga ggt gaa ggt gat gtt ggt caa cgc att cgt gat gag ata Gly Arg Gly Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile 655 660 665	2020
tta gta atc cag aga aat aat gac tgc aaa ggt gga atg atg gag gag Leu Val Ile Gln Arg Asn Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met Met Glu Glu 670 675 680	2068

tgg cac cag aaa ctg cac aac aat aca agc cca gat gat gta gtg atc Trp His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val Val Ile 685 690 695	2116
tgc cag gcc cta ctt gat tat atc aag agt gat ttt gat act ggt gtt Cys Gln Ala Leu Leu Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Thr Gly Val 700 705 710 715	2164
tac tgg gac acc ttg aaa aaa ggt ggt ata aca aaa gag cgt cta ttg Tyr Trp Asp Thr Leu Lys Lys Gly Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu 720 725 730	2212
agc tat gat cga ccg att cat tca gag cca aat ttc agg agt gaa cag Ser Tyr Asp Arg Pro Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Ser Glu Gln 735 740 745	2260
aaa gat agc tta ctc cgt gac ttg ggc aat tat atg aga agc ctc aag Lys Asp Ser Leu Leu Arg Asp Leu Gly Asn Tyr Met Arg Ser Leu Lys 750 755 760	2308
gca gtg cat tct ggt gct gat ctt gaa tct gct ata gca act tgc atg Ala Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ala Thr Cys Met 765 770 775	2356
gga tac aaa tca gag ggt gaa ggt ttc atg gtt ggt gtt cag att aat Gly Tyr Lys Ser Glu Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val Gln Ile Asn 780 785 790 795	2404
cca gtg aag ggt ttg cca tct gga ttt cct aaa ttg ctt gaa ttt ata Pro Val Lys Gly Leu Pro Ser Gly Phe Pro Lys Leu Leu Glu Phe Ile 800 805 810	2452
ctt gac cat gtt gag gat aaa tca gca aga cca ctt ctt gga ggg tta Leu Asp His Val Glu Asp Lys Ser Ala Arg Pro Leu Leu Gly Gly Leu 815 820 825	2500
ttg gag gct cga gct gaa cta cac cct ttg ctc ctt ggc tct cct gaa Leu Glu Ala Arg Ala Glu Leu His Pro Leu Leu Leu Gly Ser Pro Glu 830 835 840	2548
cgc atg aag gat ctt atc ttt tta gac att gct ctt gat tct act ttc Arg Met Lys Asp Leu Ile Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp Ser Thr Phe 845 850 855	2596
agg aca gca gtc gaa aga tca tat gag gag ctc aat aat gta gaa cca Arg Thr Ala Val Glu Arg Ser Tyr Glu Glu Leu Asn Asn Val Glu Pro 860 865 870 875	2644
gag aaa att atg tac ttc atc agt ctt gtc ctt gaa aat ctt gct tta Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu 880 885 890	2692
tcc acc gac gac aat gaa gat atc cta tat tgc tta aag gga tgg aat Ser Thr Asp Asp Asn Glu Asp Ile Leu Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asn 895 900 905	2740
caa gcc gtg gaa atg gct aaa cag aaa aac aac caa tgg gct ctc tat	2788

Gln Ala Val Glu Met Ala Lys	Gln Lys Asn Asn Gln Trp Ala Leu Tyr	
910	915	920
gct aaa gca ttt ctg gac aga acc aga ctt gcc ctt gca agc aag gga	2836	
Ala Lys Ala Phe Leu Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala Ser Lys Gly		
925	930	935
gaa caa tac tat aat ttg atg cag ccc tca gct gaa tat ctt ggc tcg	2884	
Glu Gln Tyr Tyr Asn Leu Met Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser		
940	945	950
955		
tta ctt aac att gac caa tgg gca gtt aat atc ttt aca gaa gaa att	2932	
Leu Leu Asn Ile Asp Gln Trp Ala Val Asn Ile Phe Thr Glu Glu Ile		
960	965	970
att cgt ggt gga tca gct gct acc ctg tct gct ctt ctg aat cgg att	2980	
Ile Arg Gly Gly Ser Ala Ala Thr Leu Ser Ala Leu Leu Asn Arg Ile		
975	980	985
gat cct gtt ctt agg aat gtt gca cag ctt gga agt tgg cag gtt ata	3028	
Asp Pro Val Leu Arg Asn Val Ala Gln Leu Gly Ser Trp Gln Val Ile		
990	995	1000
agc cca gtt gaa gta tca ggt tac att gta gtg gtt gat gaa ttg	3073	
Ser Pro Val Glu Val Ser Gly Tyr Ile Val Val Val Asp Glu Leu		
1005	1010	1015
ctt gct gtt caa aac aaa tcc tat gat aaa cca act atc ctt gtg	3118	
Leu Ala Val Gln Asn Lys Ser Tyr Asp Lys Pro Thr Ile Leu Val		
1020	1025	1030
gca aag agt gtc aag gga gag gaa gaa ata cca gat gga gtt gtt	3163	
Ala Lys Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Val Val		
1035	1040	1045
ggt gtt att aca cct gat atg cca gat gtt ctc tcc cat gta tca	3208	
Gly Val Ile Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser		
1050	1055	1060
gtc cga gca agg aat tgc aag gtt tta ttt gca aca tgc ttt gat	3253	
Val Arg Ala Arg Asn Cys Lys Val Leu Phe Ala Thr Cys Phe Asp		
1065	1070	1075
cct aac acc ttg tct gaa ctc caa gga cat gat ggg aaa gtg ttt	3298	
Pro Asn Thr Leu Ser Glu Leu Gln Gly His Asp Gly Lys Val Phe		
1080	1085	1090
tcc ttc aaa cct act tct gca gat atc acc tat agg gag att cca	3343	
Ser Phe Lys Pro Thr Ser Ala Asp Ile Thr Tyr Arg Glu Ile Pro		
1095	1100	1105
gag agt gaa ctg caa tca ggt tct cta aat gca gaa gct ggc cag	3388	
Glu Ser Glu Leu Gln Ser Gly Ser Leu Asn Ala Glu Ala Gly Gln		
1110	1115	1120
gca gtg cca tct gtg tca tta gtc aag aag aag ttt ctt gga aaa	3433	
Ala Val Pro Ser Val Ser Leu Val Lys Lys Lys Phe Leu Gly Lys		

1125	1130	1135	
tat gca ata tca gca gaa gaa ttc tct gag gaa atg gtt ggg gcc Tyr Ala Ile Ser Ala Glu Glu Phe Ser Glu Glu Met Val Gly Ala 1140 1145 1150			3478
aag tct cgc aac gta gca tac ctc aaa gga aaa gta ccc tca tgg Lys Ser Arg Asn Val Ala Tyr Leu Lys Gly Lys Val Pro Ser Trp 1155 1160 1165			3523
gtt ggt gtc cct aca tca gtt gcg att cca ttt ggg acc ttt gag Val Gly Val Pro Thr Ser Val Ala Ile Pro Phe Gly Thr Phe Glu 1170 1175 1180			3568
aag gtt ttg tct gat gaa atc aat aag gaa gtc gcg caa acc ata Lys Val Leu Ser Asp Glu Ile Asn Lys Glu Val Ala Gln Thr Ile 1185 1190 1195			3613
caa atg ctg aag gga aaa ctt gct caa gat gat ttt agt gct cta Gln Met Leu Lys Gly Lys Leu Ala Gln Asp Asp Phe Ser Ala Leu 1200 1205 1210			3658
ggc gaa ata cgg aaa act gtt ctc aat tta act gct cct act caa Gly Glu Ile Arg Lys Thr Val Leu Asn Leu Thr Ala Pro Thr Gln 1215 1220 1225			3703
ctg atc aag gaa ctg aag gag aag atg cta ggc tct gga atg ccc Leu Ile Lys Glu Leu Lys Glu Lys Met Leu Gly Ser Gly Met Pro 1230 1235 1240			3748
tgg cct gga gat gaa ggt gac caa cgt tgg gag caa gca tgg atg Trp Pro Gly Asp Glu Gly Asp Gln Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met 1245 1250 1255			3793
gca att aaa aag gtt tgg gcg tca aaa tgg aat gaa aga gca tat Ala Ile Lys Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr 1260 1265 1270			3838
ttt agc act cgt aag gtg aag ctt gat cat gac tac ctt tcc atg Phe Ser Thr Arg Lys Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Ser Met 1275 1280 1285			3883
gct gta ctt gta caa gaa att gtc aat gca gac tat gcc ttt gtc Ala Val Leu Val Gln Glu Ile Val Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val 1290 1295 1300			3928
att cat act act aac cca tca tcg gga gat tcg tct gag ata tat Ile His Thr Thr Asn Pro Ser Ser Gly Asp Ser Ser Glu Ile Tyr 1305 1310 1315			3973
gct gaa gtg gtg aaa ggg ctt gga gaa aca ctt gta gga gcc tat Ala Glu Val Val Lys Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr 1320 1325 1330			4018
cct ggt cgc gcc atg agc ttt gta tgt aag aaa aac gac ctt gac Pro Gly Arg Ala Met Ser Phe Val Cys Lys Lys Asn Asp Leu Asp 1335 1340 1345			4063

tct ccc aag gta ctg ggt ttc cca agc aag cca att ggt gtc ttc	4108
Ser Pro Lys Val Leu Gly Phe Pro Ser Lys Pro Ile Gly Val Phe	
1350 1355 1360	

ata aag aga tca atc atc ttt cgt tcg gat tcc aac ggt gag gat	4153
Ile Lys Arg Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp	
1365 1370 1375	

tta gaa ggg tat gct gga gca aga ctg tat gat agt gtc cct atg	4198
Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Arg Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met	
1380 1385 1390	

gat gag gaa gat gaa gtc ata gtc gac tac aac aac gga ccc ctc	4243
Asp Glu Glu Asp Glu Val Ile Val Asp Tyr Asn Asn Gly Pro Leu	
1395 1400 1405	

att aca gat cag gga ttc caa aaa tcc aac ctc ccg agc att gca	4288
Ile Thr Asp Gln Gly Phe Gln Lys Ser Asn Leu Pro Ser Ile Ala	
1410 1415 1420	

ccg gct ggt cat gcc att gag gag ctt tat ggg tcc cca cag gat	4333
Pro Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser Pro Gln Asp	
1425 1430 1435	

gtt gag ggt gca gtg aag gaa ggg aag cta tac gta gta cag aca	4378
Val Glu Gly Ala Val Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Val Val Gln Thr	
1440 1445 1450	

aga cca cag atg taa tctatatgta tattttatag ccaagtcaat caggcaatgt	4433
Arg Pro Gln Met	
1455	

tgtagagtaa gatatacggg ccgtgggaca tgtataacac gttacgccct tttttttatt	4493
-------------------------------------------------------------------	------

atttgctttc atactcacia tacactaatt tatagggctt attttatcgc caaaaaaaaa	4553
-------------------------------------------------------------------	------

aaaaaaaaaga aaaaaaaaaaaa aaa	4576
------------------------------	------

<210> 13
 <211> 1457
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa

<400> 13

Met Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Ala Ala Glu Arg Cys Ala Leu
1 5 10 15

Gly Leu Gly Val His Ala Arg Pro Ala Ser Pro Ser Pro Ala Leu Leu
20 25 30

Pro Pro Ala Ala Leu Arg Arg Gly Arg Arg Leu Pro Ala Ala Thr Thr
35 40 45

Thr Leu Ala Val Ser Arg Arg Ser Leu Leu Ala Pro Arg Ala Ile Ala
50 55 60

Ala Ser Thr Gly Arg Ala Ser Pro Gly Leu Val Gly Arg Phe Thr Leu
65 70 75 80

Asp Ala Asn Ser Glu Leu Lys Val Thr Leu Asn Pro Ala Pro Gln Gly
85 90 95

Ser Val Val Glu Ile Asn Leu Glu Ala Thr Asn Thr Ser Gly Ser Leu
100 105 110

Ile Leu His Trp Gly Ala Leu Arg Pro Asp Arg Gly Glu Trp Leu Leu
115 120 125

Pro Ser Arg Lys Pro Asp Gly Thr Thr Val Tyr Lys Asn Arg Ala Leu
130 135 140

Arg Thr Pro Phe Ile Lys Ser Gly Asp Asn Ser Thr Leu Lys Ile Glu
145 150 155 160

Ile Asp Asp Pro Ala Val Gln Ala Ile Glu Phe Leu Ile Phe Asp Glu
165 170 175

Ala Arg Asn Asn Trp Tyr Lys Asn Asn Gly Gln Asn Phe Gln Ile Gln
180 185 190

Leu Gln Ala Ser Gln Tyr Gln Gly Gln Gly Thr Ser Thr Ala Thr Ser
195 200 205

Ser Thr Val Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Ile Gln Ser Tyr Leu Arg
210 215 220

Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Ser Tyr Thr Pro Glu Gln Glu Lys Glu
225 230 235 240

Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Glu Leu Ile Glu Glu Leu Asn Lys Gly
245 250 255

Val Ser Leu Glu Lys Leu Arg Ala Lys Leu Thr Lys Thr Pro Glu Ala
260 265 270

Thr Asp Ser Asn Ala Pro Ala Ser Glu Ser Thr Val Thr Thr Lys Val
275 280 285

Pro Glu Glu Leu Val Gln Val Gln Ala Tyr Ile Arg Trp Glu Lys Ala
290 295 300

Gly Lys Pro Asn Tyr Ala Pro Glu Lys Gln Leu Val Glu Phe Glu Glu
305 310 315 320

Ala Arg Lys Glu Leu Gln Ser Glu Leu Asp Lys Gly Thr Ser Val Glu
325 330 335

Gln Leu Arg Asn Lys Ile Leu Lys Gly Asn Ile Glu Thr Lys Val Ser
340 345 350

Lys Gln Leu Lys Asp Lys Lys Tyr Phe Ser Val Glu Arg Ile Gln Arg
355 360 365

Lys Lys Arg Asp Ile Val Gln Leu Leu Lys Lys His Lys Pro Thr Val
370 375 380

Met Glu Ala Gln Val Glu Thr Pro Lys Gln Pro Thr Val Leu Asp Leu
385 390 395 400

Phe Thr Lys Ser Leu Gln Glu Gln Asp Asn Cys Glu Val Leu Ser Arg
405 410 415

Lys Leu Phe Lys Phe Gly Asp Lys Glu Ile Leu Gly Ile Thr Thr Val
420 425 430

Ala Leu Gly Lys Thr Lys Val His Leu Ala Thr Asn Tyr Met Glu Pro
435 440 445

Leu Ile Leu His Trp Ala Leu Ser Lys Glu Asn Gly Glu Trp Gln Ala
450 455 460

Pro Pro Ser Ser Ile Leu Pro Ser Gly Ser Ser Leu Leu Asp Lys Ala
465 470 475 480

Cys Glu Thr Ser Phe Ser Glu Tyr Glu Leu Asn Gly Leu His Cys Gln
485 490 495

Val Val Glu Ile Glu Leu Asp Asp Gly Gly Tyr Lys Arg Met Pro Phe
500 505 510

Val Leu Arg Ser Gly Glu Thr Trp Met Lys Asn Asn Gly Ser Asp Phe
515 520 525

Tyr Leu Asp Phe Ser Thr Lys Val Ala Lys Asn Thr Lys Asp Thr Gly
530 535 540

Asp Ala Gly Lys Gly Thr Ala Glu Ala Leu Leu Glu Arg Ile Ala Asp
545 550 555 560

Leu Glu Glu Asp Ala Gln Arg Ser Leu Met His Arg Phe Asn Ile Ala
565 570 575

Ala Asp Leu Val Asp Gln Ala Arg Asp Asn Gly Leu Leu Gly Ile Ile
580 585 590

Gly Ile Phe Val Trp Ile Gly Phe Met Ala Thr Arg Gln Leu Ile Trp
595 600 605

Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp
610 615 620

Arg Phe Thr Asp Asp Leu Glu Asn Met Tyr Arg Thr Tyr Pro Gln Tyr
625 630 635 640

Gln Glu Ile Leu Arg Met Ile Met Ser Ala Val Gly Arg Gly Gly Glu
645 650 655

Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg
660 665 670

Asn Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met Met Glu Glu Trp His Gln Lys Leu
675 680 685

His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val Val Ile Cys Gln Ala Leu Leu
690 695 700

Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Thr Gly Val Tyr Trp Asp Thr Leu
705 710 715 720

Lys Lys Gly Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Pro

725								730				735			
Ile	His	Ser	Glu	Pro	Asn	Phe	Arg	Ser	Glu	Gln	Lys	Asp	Ser	Leu	Leu
			740								745				750
Arg	Asp	Leu	Gly	Asn	Tyr	Met	Arg	Ser	Leu	Lys	Ala	Val	His	Ser	Gly
			755												765
Ala	Asp	Leu	Glu	Ser	Ala	Ile	Ala	Thr	Cys	Met	Gly	Tyr	Lys	Ser	Glu
			770												780
Gly	Glu	Gly	Phe	Met	Val	Gly	Val	Gln	Ile	Asn	Pro	Val	Lys	Gly	Leu
															800
Pro	Ser	Gly	Phe	Pro	Lys	Leu	Leu	Glu	Phe	Ile	Leu	Asp	His	Val	Glu
															815
Asp	Lys	Ser	Ala	Arg	Pro	Leu	Leu	Gly	Gly	Leu	Leu	Glu	Ala	Arg	Ala
															830
Glu	Leu	His	Pro	Leu	Leu	Leu	Gly	Ser	Pro	Glu	Arg	Met	Lys	Asp	Leu
															845
Ile	Phe	Leu	Asp	Ile	Ala	Leu	Asp	Ser	Thr	Phe	Arg	Thr	Ala	Val	Glu
															860
Arg	Ser	Tyr	Glu	Glu	Leu	Asn	Asn	Val	Glu	Pro	Glu	Lys	Ile	Met	Tyr
															880
Phe	Ile	Ser	Leu	Val	Leu	Glu	Asn	Leu	Ala	Leu	Ser	Thr	Asp	Asp	Asn
															895
Glu	Asp	Ile	Leu	Tyr	Cys	Leu	Lys	Gly	Trp	Asn	Gln	Ala	Val	Glu	Met
															910
Ala	Lys	Gln	Lys	Asn	Asn	Gln	Trp	Ala	Leu	Tyr	Ala	Lys	Ala	Phe	Leu
															925
Asp	Arg	Thr	Arg	Leu	Ala	Leu	Ala	Ser	Lys	Gly	Glu	Gln	Tyr	Tyr	Asn
															940
Leu	Met	Gln	Pro	Ser	Ala	Glu	Tyr	Leu	Gly	Ser	Leu	Leu	Asn	Ile	Asp
															960

Gln Trp Ala Val Asn Ile Phe Thr Glu Glu Ile Ile Arg Gly Gly Ser
965 970 975

Ala Ala Thr Leu Ser Ala Leu Leu Asn Arg Ile Asp Pro Val Leu Arg
980 985 990

Asn Val Ala Gln Leu Gly Ser Trp Gln Val Ile Ser Pro Val Glu Val
995 1000 1005

Ser Gly Tyr Ile Val Val Val Asp Glu Leu Leu Ala Val Gln Asn
1010 1015 1020

Lys Ser Tyr Asp Lys Pro Thr Ile Leu Val Ala Lys Ser Val Lys
1025 1030 1035

Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Val Val Gly Val Ile Thr Pro
1040 1045 1050

Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala Arg Asn
1055 1060 1065

Cys Lys Val Leu Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn Thr Leu Ser
1070 1075 1080

Glu Leu Gln Gly His Asp Gly Lys Val Phe Ser Phe Lys Pro Thr
1085 1090 1095

Ser Ala Asp Ile Thr Tyr Arg Glu Ile Pro Glu Ser Glu Leu Gln
1100 1105 1110

Ser Gly Ser Leu Asn Ala Glu Ala Gly Gln Ala Val Pro Ser Val
1115 1120 1125

Ser Leu Val Lys Lys Lys Phe Leu Gly Lys Tyr Ala Ile Ser Ala
1130 1135 1140

Glu Glu Phe Ser Glu Glu Met Val Gly Ala Lys Ser Arg Asn Val
1145 1150 1155

Ala Tyr Leu Lys Gly Lys Val Pro Ser Trp Val Gly Val Pro Thr
1160 1165 1170

Ser Val Ala Ile Pro Phe Gly Thr Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp
1175 1180 1185

Glu Ile Asn Lys Glu Val Ala Gln Thr Ile Gln Met Leu Lys Gly
1190 1195 1200

Lys Leu Ala Gln Asp Asp Phe Ser Ala Leu Gly Glu Ile Arg Lys
1205 1210 1215

Thr Val Leu Asn Leu Thr Ala Pro Thr Gln Leu Ile Lys Glu Leu
1220 1225 1230

Lys Glu Lys Met Leu Gly Ser Gly Met Pro Trp Pro Gly Asp Glu
1235 1240 1245

Gly Asp Gln Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala Ile Lys Lys Val
1250 1255 1260

Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser Thr Arg Lys
1265 1270 1275

Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Ser Met Ala Val Leu Val Gln
1280 1285 1290

Glu Ile Val Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr Thr Asn
1295 1300 1305

Pro Ser Ser Gly Asp Ser Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val Val Lys
1310 1315 1320

Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Met
1325 1330 1335

Ser Phe Val Cys Lys Lys Asn Asp Leu Asp Ser Pro Lys Val Leu
1340 1345 1350

Gly Phe Pro Ser Lys Pro Ile Gly Val Phe Ile Lys Arg Ser Ile
1355 1360 1365

Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala
1370 1375 1380

Gly Ala Arg Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Glu Asp Glu
1385 1390 1395

Val Ile Val Asp Tyr Asn Asn Gly Pro Leu Ile Thr Asp Gln Gly
1400 1405 1410

Phe Gln Lys Ser Asn Leu Pro Ser Ile Ala Pro Ala Gly His Ala
1415 1420 1425

Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser Pro Gln Asp Val Glu Gly Ala Val
1430 1435 1440

Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Val Val Gln Thr Arg Pro Gln Met
1445 1450 1455

<210> 14
<211> 4745
<212> DNA
<213> Glycine max

<220>
<221> CDS
<222> (103)..(4482)
<223>

<300>
<308> NCBI / AR400815
<309> 2003-12-18

<400> 14
gcaccagcct ctccccattt tcacgtgatt cccaatctca cactcttctc acaccttcaa 60
ccgattcaac gcaacaaagt gataaagtgt ggatccggga ag atg agc cag agt 114
Met Ser Gln Ser
1

atc ttc cac cag acg gtg ctt tgt caa acg caa acg gtt gcg gag cat 162
Ile Phe His Gln Thr Val Leu Cys Gln Thr Gln Thr Val Ala Glu His
5 10 15 20

caa agt aag gtt agt tcc ttg gag gtg agt gcg aac aaa gga aag aag 210
Gln Ser Lys Val Ser Ser Leu Glu Val Ser Ala Asn Lys Gly Lys Lys
25 30 35

aac ctc ttt ttg gct cct aca aat ttt cgc ggg agc agg ctg tgt gtg 258
Asn Leu Phe Leu Ala Pro Thr Asn Phe Arg Gly Ser Arg Leu Cys Val
40 45 50

agg aaa cgc aaa tta acc atg gga agg cac cac cac cgc cac gtt gac 306
Arg Lys Arg Lys Leu Thr Met Gly Arg His His His Arg His Val Asp
55 60 65

gct gtt cca cgc gct gtt tta acc acc aat ctg gct tct gag ctt tct Ala Val Pro Arg Ala Val Leu Thr Thr Asn Leu Ala Ser Glu Leu Ser 70 75 80	354
ggg aag ttc aac ctt gac gga aat att gag ttg cag att gct gtt agt Gly Lys Phe Asn Leu Asp Gly Asn Ile Glu Leu Gln Ile Ala Val Ser 85 90 95 100	402
tct tca gaa cca gga gct gca aga caa gta gat ttt aag gtt tca tat Ser Ser Glu Pro Gly Ala Ala Arg Gln Val Asp Phe Lys Val Ser Tyr 105 110 115	450
aat agt gag tct ctg ctt tta cat tgg gga gtt gtg cgt gat cag cca Asn Ser Glu Ser Leu Leu Leu His Trp Gly Val Val Arg Asp Gln Pro 120 125 130	498
ggg aag tgg gtt ctt cct tct cgt cac cca gat gga act aaa aat tat Gly Lys Trp Val Leu Pro Ser Arg His Pro Asp Gly Thr Lys Asn Tyr 135 140 145	546
aag agc aga gct ctt aga act cct ttt gtg aaa tcc gac tca gga tct Lys Ser Arg Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Lys Ser Asp Ser Gly Ser 150 155 160	594
ttc ctt aaa ata gaa att gac gat cct gct gca caa gcc att gag ttc Phe Leu Lys Ile Glu Ile Asp Asp Pro Ala Ala Gln Ala Ile Glu Phe 165 170 175 180	642
ctc ata ctt gat gag gct aag aat aag tgg ttt aag aat aat ggt gag Leu Ile Leu Asp Glu Ala Lys Asn Lys Trp Phe Lys Asn Asn Gly Glu 185 190 195	690
aac ttt cac atc aag tta cca gta aaa agc aag cta tct caa gaa gtt Asn Phe His Ile Lys Leu Pro Val Lys Ser Lys Leu Ser Gln Glu Val 200 205 210	738
tca gtt cct gaa gac ctt gta cag att caa gca tat ctt agg tgg gaa Ser Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Ile Gln Ala Tyr Leu Arg Trp Glu 215 220 225	786
cga aag ggt aag cag atg tac act cca gag caa gag aag gag gaa tat Arg Lys Gly Lys Gln Met Tyr Thr Pro Glu Gln Glu Lys Glu Glu Tyr 230 235 240	834
gaa gca gct cgg aat gaa cta ttg gag gaa gta gcc agg ggt act tct Glu Ala Ala Arg Asn Glu Leu Leu Glu Glu Val Ala Arg Gly Thr Ser 245 250 255 260	882
gtg cga gat ctc cat gca agg tta act aag aaa act aaa gct gcc gaa Val Arg Asp Leu His Ala Arg Leu Thr Lys Lys Thr Lys Ala Ala Glu 265 270 275	930
gta aag gag cct tct gtt tct gaa aca aag acc atc cct gat gaa ctt Val Lys Glu Pro Ser Val Ser Glu Thr Lys Thr Ile Pro Asp Glu Leu 280 285 290	978

gta cag att caa gct ttt ata cga tgg gaa aaa gct ggg aag cct aac Val Gln Ile Gln Ala Phe Ile Arg Trp Glu Lys Ala Gly Lys Pro Asn 295 300 305	1026
tac tct cgg gaa caa caa ctt atg gaa ttt gag gaa gca aga aaa gaa Tyr Ser Arg Glu Gln Gln Leu Met Glu Phe Glu Glu Ala Arg Lys Glu 310 315 320	1074
ttg tta gaa gag ctt gag aag ggg gct tct ctg gat gcg ata cgg aag Leu Leu Glu Glu Leu Glu Lys Gly Ala Ser Leu Asp Ala Ile Arg Lys 325 330 335 340	1122
aag att gtc aaa gga gag ata caa act aaa gtt gcc aag caa ttg aaa Lys Ile Val Lys Gly Glu Ile Gln Thr Lys Val Ala Lys Gln Leu Lys 345 350 355	1170
acc aaa aaa tac ttt cgt gct gaa aga ata cag agg aaa aag aga gat Thr Lys Lys Tyr Phe Arg Ala Glu Arg Ile Gln Arg Lys Lys Arg Asp 360 365 370	1218
ttg atg cag ctt atc aac cga aat gtt gca caa aat ata gtt gaa caa Leu Met Gln Leu Ile Asn Arg Asn Val Ala Gln Asn Ile Val Glu Gln 375 380 385	1266
gtt ata gat gct cca aaa gcc ttg aca gta att gaa cat tat gcc aat Val Ile Asp Ala Pro Lys Ala Leu Thr Val Ile Glu His Tyr Ala Asn 390 395 400	1314
gca agg gaa gaa tat gaa agt ggt cct gtt ttg aat aag aca ata tac Ala Arg Glu Glu Tyr Glu Ser Gly Pro Val Leu Asn Lys Thr Ile Tyr 405 410 415 420	1362
aag ctt ggt gat aat tat ctt ctg gtc ctt gtt acc aag gat gct ggc Lys Leu Gly Asp Asn Tyr Leu Leu Val Leu Val Thr Lys Asp Ala Gly 425 430 435	1410
aag att aag gtt cac cta gct aca gac tcg aaa aaa cct ttt aca ctt Lys Ile Lys Val His Leu Ala Thr Asp Ser Lys Lys Pro Phe Thr Leu 440 445 450	1458
cac tgg gcc tta tct aga aca tct gaa gag tgg ttg gta cca cct gaa His Trp Ala Leu Ser Arg Thr Ser Glu Glu Trp Leu Val Pro Pro Glu 455 460 465	1506
act gct ctg ccc cct gga tct gtt act atg aat gag gcc gct gaa aca Thr Ala Leu Pro Pro Gly Ser Val Thr Met Asn Glu Ala Ala Glu Thr 470 475 480	1554
cct ttc aaa gct ggt tct tcg tct cat cct tct tat gag gtc cag tcc Pro Phe Lys Ala Gly Ser Ser Ser His Pro Ser Tyr Glu Val Gln Ser 485 490 495 500	1602
ttg gat ata gag gtt gat gat gat act ttt aaa gga ata cct ttt gtc Leu Asp Ile Glu Val Asp Asp Asp Thr Phe Lys Gly Ile Pro Phe Val 505 510 515	1650
att ctg tcg gat gga gaa tgg ata aag aac aat gga tca aat ttt tat	1698

Ile Leu Ser Asp Gly Glu Trp Ile Lys Asn Asn Gly Ser Asn Phe Tyr	
520 525 530	
att gaa ttt ggt ggg aag aag cag aaa cag aag gat ttt ggc aat ggc	1746
Ile Glu Phe Gly Gly Lys Lys Gln Lys Gln Lys Asp Phe Gly Asn Gly	
535 540 545	
aaa ggt aca gcc aag ttc ttg ttg aat aaa ata gca gaa atg gaa agt	1794
Lys Gly Thr Ala Lys Phe Leu Leu Asn Lys Ile Ala Glu Met Glu Ser	
550 555 560	
gag gca caa aag tcc ttc atg cat cga ttt aac att gca tca gat ttg	1842
Glu Ala Gln Lys Ser Phe Met His Arg Phe Asn Ile Ala Ser Asp Leu	
565 570 575 580	
ata gat gaa gcc aaa aat gct ggt caa ctg ggt ctt gcg ggg att ttg	1890
Ile Asp Glu Ala Lys Asn Ala Gly Gln Leu Gly Leu Ala Gly Ile Leu	
585 590 595	
gtg tgg atg aga ttc atg gct aca agg cag ctc ata tgg aac aaa aat	1938
Val Trp Met Arg Phe Met Ala Thr Arg Gln Leu Ile Trp Asn Lys Asn	
600 605 610	
tac aat gtg aag cca cgt gag ata agt aaa gca cag gat agg ctt aca	1986
Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr	
615 620 625	
gac ttg ctc caa gat gtt tat gca aat tat cca cag tat agg gaa att	2034
Asp Leu Leu Gln Asp Val Tyr Ala Asn Tyr Pro Gln Tyr Arg Glu Ile	
630 635 640	
gtg agg atg atc ttg tcc act gtt ggt cgt gga ggt gaa gga gat gtc	2082
Val Arg Met Ile Leu Ser Thr Val Gly Arg Gly Gly Glu Gly Asp Val	
645 650 655 660	
gga cag agg att cgg gat gaa atc ctt gtt atc cag aga aat aat gat	2130
Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg Asn Asn Asp	
665 670 675	
tgc aaa ggt gga atg atg gag gaa tgg cac cag aaa tta cac aat aat	2178
Cys Lys Gly Gly Met Met Glu Glu Trp His Gln Lys Leu His Asn Asn	
680 685 690	
act agt cct gat gat gtt gta atc tgt cag gca cta att gat tat ata	2226
Thr Ser Pro Asp Asp Val Val Ile Cys Gln Ala Leu Ile Asp Tyr Ile	
695 700 705	
aat agt gac ttt gat att ggt gtt tac tgg aaa gca ttg aat gac aat	2274
Asn Ser Asp Phe Asp Ile Gly Val Tyr Trp Lys Ala Leu Asn Asp Asn	
710 715 720	
aga ata aca aaa gag cgg ctt ctg agc tat gac cgt gcc atc cat tct	2322
Arg Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser	
725 730 735 740	
gaa cca aat ttt agg aga gat cag aag gaa ggt ctt ctg cga gat ctg	2370
Glu Pro Asn Phe Arg Arg Asp Gln Lys Glu Gly Leu Leu Arg Asp Leu	

745	750	755	
gga aac tac atg agg act tta aag gca gtt cat tcc ggt gca gat ctt Gly Asn Tyr Met Arg Thr Leu Lys Ala Val His Ser Gly Ala Asp Leu 760 765 770			2418
gaa tct gct att tca aat tgt atg ggc tac aaa tct gag ggt cag ggc Glu Ser Ala Ile Ser Asn Cys Met Gly Tyr Lys Ser Glu Gly Gln Gly 775 780 785			2466
ttc atg gta ggg gtg aag ata aat cca gtg ccg ggt ttg cct act ggt Phe Met Val Gly Val Lys Ile Asn Pro Val Pro Gly Leu Pro Thr Gly 790 795 800			2514
ttt cca gaa tta ctt gag ttt gtc atg gaa cac gtt gaa gag aag aat Phe Pro Glu Leu Leu Glu Phe Val Met Glu His Val Glu Glu Lys Asn 805 810 815 820			2562
gtt gaa cca ctt ctt gag ggg ttg ctt gag gct cgt cag gaa ctc caa Val Glu Pro Leu Leu Glu Gly Leu Leu Glu Ala Arg Gln Glu Leu Gln 825 830 835			2610
cca tca ctc agt aaa tcc caa agt cgt ctg aaa gat ctt ata ttt ttg Pro Ser Leu Ser Lys Ser Gln Ser Arg Leu Lys Asp Leu Ile Phe Leu 840 845 850			2658
gat gtt gcc ctt gat tct aca gtt aga aca gca gtg gaa agg agt tat Asp Val Ala Leu Asp Ser Thr Val Arg Thr Ala Val Glu Arg Ser Tyr 855 860 865			2706
gag gaa tta aac aat gct gga cct gag aaa ata atg tac ttc att agc Glu Glu Leu Asn Asn Ala Gly Pro Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser 870 875 880			2754
ttg gtt ctt gaa aat ctc gca ctt tca tcg gat gac aat gaa gat ctt Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser Ser Asp Asp Asn Glu Asp Leu 885 890 895 900			2802
atc tac tgt ttg aag gga tgg gat gtt gcc tta agc atg tgc aag att Ile Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asp Val Ala Leu Ser Met Cys Lys Ile 905 910 915			2850
aaa gat act cat tgg gca ttg tac gca aaa tca gtc ctt gac aga acc Lys Asp Thr His Trp Ala Leu Tyr Ala Lys Ser Val Leu Asp Arg Thr 920 925 930			2898
cgt ctt gca cta aca aac aag gct cat tta tac cag gaa att ctg caa Arg Leu Ala Leu Thr Asn Lys Ala His Leu Tyr Gln Glu Ile Leu Gln 935 940 945			2946
cca tcg gca gaa tat ctt gga tca ctg ctt ggc gtg gac aaa tgg gcc Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Leu Leu Gly Val Asp Lys Trp Ala 950 955 960			2994
gtg gaa ata ttt act gaa gaa att atc cgt gct gga tct gct gct tct Val Glu Ile Phe Thr Glu Glu Ile Ile Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ser 965 970 975 980			3042

ttg tct act ctt cta aat cga ctg gat cct gtg ctc cga aag aca gct Leu Ser Thr Leu Leu Asn Arg Leu Asp Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala 985 990 995	3090
cat ctt gga agc tgg cag gtt att agt cca gtt gaa act gtt gga His Leu Gly Ser Trp Gln Val Ile Ser Pro Val Glu Thr Val Gly 1000 1005 1010	3135
tat gtt gag gtt gta gat gag ttg ctt act gtt caa aac aaa tca Tyr Val Glu Val Val Asp Glu Leu Leu Thr Val Gln Asn Lys Ser 1015 1020 1025	3180
tat gag cga cct aca att ttg ata gcc aat agt gtg aaa gga gag Tyr Glu Arg Pro Thr Ile Leu Ile Ala Asn Ser Val Lys Gly Glu 1030 1035 1040	3225
gaa gaa att cca gat ggt aca gtt gct gtc ctg aca cct gat atg Glu Glu Ile Pro Asp Gly Thr Val Ala Val Leu Thr Pro Asp Met 1045 1050 1055	3270
cct gat gtc cta tcc cat gtt tct gta cga gca aga aat agc aag Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala Arg Asn Ser Lys 1060 1065 1070	3315
gtg tgt ttt gct aca tgc ttt gat ccc aat atc ctg gct aac ctc Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn Ile Leu Ala Asn Leu 1075 1080 1085	3360
caa gaa tat aaa gga aag ctt tta cgc tta aag cct aca tct gct Gln Glu Tyr Lys Gly Lys Leu Leu Arg Leu Lys Pro Thr Ser Ala 1090 1095 1100	3405
gat gta gtt tat agt gag gtg aag gag ggt gag ttt att gat gac Asp Val Val Tyr Ser Glu Val Lys Glu Gly Glu Phe Ile Asp Asp 1105 1110 1115	3450
aaa tca act caa ctg aaa gat gtt ggt tct gtg tca ccc ata tct Lys Ser Thr Gln Leu Lys Asp Val Gly Ser Val Ser Pro Ile Ser 1120 1125 1130	3495
ctg gcc aga aag aag ttt agt ggt aga tat gct gtc tca tct gaa Leu Ala Arg Lys Lys Phe Ser Gly Arg Tyr Ala Val Ser Ser Glu 1135 1140 1145	3540
gaa ttc act ggt gaa atg gtt gga gct aaa tct cgt aat atc tct Glu Phe Thr Gly Glu Met Val Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ser 1150 1155 1160	3585
tat tta aaa ggg aaa gta gct tct tgg att gga att cct acc tca Tyr Leu Lys Gly Lys Val Ala Ser Trp Ile Gly Ile Pro Thr Ser 1165 1170 1175	3630
gtt gcc ata cca ttt gga gtt ttt gaa cat gtt ctt tct gat aaa Val Ala Ile Pro Phe Gly Val Phe Glu His Val Leu Ser Asp Lys 1180 1185 1190	3675

cca aac cag gca	gtg gct gag agg gtc	aat aat ttg aaa aag aag	3720
Pro Asn Gln Ala	Val Ala Glu Arg Val	Asn Asn Leu Lys Lys Lys	
1195	1200	1205	
tta act gag gga	gac ttc agt gtt ctc	aag gag att cgt gaa aca	3765
Leu Thr Glu Gly	Asp Phe Ser Val Leu	Lys Glu Ile Arg Glu Thr	
1210	1215	1220	
gtt cta cag ttg	aat gca cca tcc cag	ttg gta gag gag ttg aaa	3810
Val Leu Gln Leu	Asn Ala Pro Ser Gln	Leu Val Glu Glu Leu Lys	
1225	1230	1235	
act aaa atg aag	agt tct gga atg ccg	tgg ccg ggt gat gaa ggt	3855
Thr Lys Met Lys	Ser Ser Gly Met Pro	Trp Pro Gly Asp Glu Gly	
1240	1245	1250	
gaa caa cga tgg	gaa caa gct tgg ata	gct ata aaa aag gtg tgg	3900
Glu Gln Arg Trp	Glu Gln Ala Trp Ile	Ala Ile Lys Lys Val Trp	
1255	1260	1265	
ggc tca aag tgg	aat gaa aga gca tac	ttc agc aca aga aaa gtg	3945
Gly Ser Lys Trp	Asn Glu Arg Ala Tyr	Phe Ser Thr Arg Lys Val	
1270	1275	1280	
aaa ctc gac cac	gaa tat ctt tcc atg	gca gtc ctg gtt cag gaa	3990
Lys Leu Asp His	Glu Tyr Leu Ser Met	Ala Val Leu Val Gln Glu	
1285	1290	1295	
gtg ata aat gct	gac tat gct ttt gtc	atc cac aca act aac cct	4035
Val Ile Asn Ala	Asp Tyr Ala Phe Val	Ile His Thr Thr Asn Pro	
1300	1305	1310	
gcc tct gga gat	tca tcg gaa ata tat	gct gag gtg gta aag gga	4080
Ala Ser Gly Asp	Ser Ser Glu Ile Tyr	Ala Glu Val Val Lys Gly	
1315	1320	1325	
ctt gga gaa aca	ctg gtt gga gct tat	cct ggt cgt gct ttg agt	4125
Leu Gly Glu Thr	Leu Val Gly Ala Tyr	Pro Gly Arg Ala Leu Ser	
1330	1335	1340	
ttt atc tgc aag	aaa cgt gat ttg aac	tct cct cag gtc ttg ggt	4170
Phe Ile Cys Lys	Lys Arg Asp Leu Asn	Ser Pro Gln Val Leu Gly	
1345	1350	1355	
tat cct agc aaa	cct gtc ggc cta ttt	ata aga cag tca att att	4215
Tyr Pro Ser Lys	Pro Val Gly Leu Phe	Ile Arg Gln Ser Ile Ile	
1360	1365	1370	
ttc cga tct gat	tcc aat ggt gaa gat	cta gaa ggt tat gct ggt	4260
Phe Arg Ser Asp	Ser Asn Gly Glu Asp	Leu Glu Gly Tyr Ala Gly	
1375	1380	1385	
gca ggt ctt tat	gac agt gtg cca atg	gat gaa gcc gag aag gtg	4305
Ala Gly Leu Tyr	Asp Ser Val Pro Met	Asp Glu Ala Glu Lys Val	
1390	1395	1400	
gtg ctt gat tat	tca tca gac aaa ctg	atc ctt gat ggt agt ttt	4350

Ile Ala Val Ser Ser Ser Glu Pro Gly Ala Ala Arg Gln Val Asp Phe
100 105 110

Lys Val Ser Tyr Asn Ser Glu Ser Leu Leu Leu His Trp Gly Val Val
115 120 125

Arg Asp Gln Pro Gly Lys Trp Val Leu Pro Ser Arg His Pro Asp Gly
130 135 140

Thr Lys Asn Tyr Lys Ser Arg Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Lys Ser
145 150 155 160

Asp Ser Gly Ser Phe Leu Lys Ile Glu Ile Asp Asp Pro Ala Ala Gln
165 170 175

Ala Ile Glu Phe Leu Ile Leu Asp Glu Ala Lys Asn Lys Trp Phe Lys
180 185 190

Asn Asn Gly Glu Asn Phe His Ile Lys Leu Pro Val Lys Ser Lys Leu
195 200 205

Ser Gln Glu Val Ser Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Ile Gln Ala Tyr
210 215 220

Leu Arg Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Met Tyr Thr Pro Glu Gln Glu
225 230 235 240

Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Asn Glu Leu Leu Glu Glu Val Ala
245 250 255

Arg Gly Thr Ser Val Arg Asp Leu His Ala Arg Leu Thr Lys Lys Thr
260 265 270

Lys Ala Ala Glu Val Lys Glu Pro Ser Val Ser Glu Thr Lys Thr Ile
275 280 285

Pro Asp Glu Leu Val Gln Ile Gln Ala Phe Ile Arg Trp Glu Lys Ala
290 295 300

Gly Lys Pro Asn Tyr Ser Arg Glu Gln Gln Leu Met Glu Phe Glu Glu
305 310 315 320

Ala Arg Lys Glu Leu Leu Glu Glu Leu Glu Lys Gly Ala Ser Leu Asp

325	330	335
Ala Ile Arg Lys Lys Ile Val Lys Gly Glu Ile Gln Thr Lys Val Ala		
340	345	350
Lys Gln Leu Lys Thr Lys Lys Tyr Phe Arg Ala Glu Arg Ile Gln Arg		
355	360	365
Lys Lys Arg Asp Leu Met Gln Leu Ile Asn Arg Asn Val Ala Gln Asn		
370	375	380
Ile Val Glu Gln Val Ile Asp Ala Pro Lys Ala Leu Thr Val Ile Glu		
385	390	395
400		
His Tyr Ala Asn Ala Arg Glu Glu Tyr Glu Ser Gly Pro Val Leu Asn		
405	410	415
Lys Thr Ile Tyr Lys Leu Gly Asp Asn Tyr Leu Leu Val Leu Val Thr		
420	425	430
Lys Asp Ala Gly Lys Ile Lys Val His Leu Ala Thr Asp Ser Lys Lys		
435	440	445
Pro Phe Thr Leu His Trp Ala Leu Ser Arg Thr Ser Glu Glu Trp Leu		
450	455	460
Val Pro Pro Glu Thr Ala Leu Pro Pro Gly Ser Val Thr Met Asn Glu		
465	470	475
480		
Ala Ala Glu Thr Pro Phe Lys Ala Gly Ser Ser Ser His Pro Ser Tyr		
485	490	495
Glu Val Gln Ser Leu Asp Ile Glu Val Asp Asp Asp Thr Phe Lys Gly		
500	505	510
Ile Pro Phe Val Ile Leu Ser Asp Gly Glu Trp Ile Lys Asn Asn Gly		
515	520	525
Ser Asn Phe Tyr Ile Glu Phe Gly Gly Lys Lys Gln Lys Gln Lys Asp		
530	535	540
Phe Gly Asn Gly Lys Gly Thr Ala Lys Phe Leu Leu Asn Lys Ile Ala		
545	550	555
560		

Glu Met Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser Phe Met His Arg Phe Asn Ile
565 570 575

Ala Ser Asp Leu Ile Asp Glu Ala Lys Asn Ala Gly Gln Leu Gly Leu
580 585 590

Ala Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe Met Ala Thr Arg Gln Leu Ile
595 600 605

Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser Lys Ala Gln
610 615 620

Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asp Val Tyr Ala Asn Tyr Pro Gln
625 630 635 640

Tyr Arg Glu Ile Val Arg Met Ile Leu Ser Thr Val Gly Arg Gly Gly
645 650 655

Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln
660 665 670

Arg Asn Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met Met Glu Glu Trp His Gln Lys
675 680 685

Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val Val Ile Cys Gln Ala Leu
690 695 700

Ile Asp Tyr Ile Asn Ser Asp Phe Asp Ile Gly Val Tyr Trp Lys Ala
705 710 715 720

Leu Asn Asp Asn Arg Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg
725 730 735

Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Arg Asp Gln Lys Glu Gly Leu
740 745 750

Leu Arg Asp Leu Gly Asn Tyr Met Arg Thr Leu Lys Ala Val His Ser
755 760 765

Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ser Asn Cys Met Gly Tyr Lys Ser
770 775 780

Glu Gly Gln Gly Phe Met Val Gly Val Lys Ile Asn Pro Val Pro Gly
785 790 795 800

Leu Pro Thr Gly Phe Pro Glu Leu Leu Glu Phe Val Met Glu His Val
805 810 815

Glu Glu Lys Asn Val Glu Pro Leu Leu Glu Gly Leu Leu Glu Ala Arg
820 825 830

Gln Glu Leu Gln Pro Ser Leu Ser Lys Ser Gln Ser Arg Leu Lys Asp
835 840 845

Leu Ile Phe Leu Asp Val Ala Leu Asp Ser Thr Val Arg Thr Ala Val
850 855 860

Glu Arg Ser Tyr Glu Glu Leu Asn Asn Ala Gly Pro Glu Lys Ile Met
865 870 875 880

Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser Ser Asp Asp
885 890 895

Asn Glu Asp Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asp Val Ala Leu Ser
900 905 910

Met Cys Lys Ile Lys Asp Thr His Trp Ala Leu Tyr Ala Lys Ser Val
915 920 925

Leu Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Thr Asn Lys Ala His Leu Tyr Gln
930 935 940

Glu Ile Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Leu Leu Gly Val
945 950 955 960

Asp Lys Trp Ala Val Glu Ile Phe Thr Glu Glu Ile Ile Arg Ala Gly
965 970 975

Ser Ala Ala Ser Leu Ser Thr Leu Leu Asn Arg Leu Asp Pro Val Leu
980 985 990

Arg Lys Thr Ala His Leu Gly Ser Trp Gln Val Ile Ser Pro Val Glu
995 1000 1005

Thr Val	Gly Tyr	Val Glu	Val Val	Val Asp	Glu Leu	Leu Leu	Thr Val	Gln	
1010			1015			1020			
Asn Lys	Ser Tyr	Glu Arg	Pro Thr	Ile Leu	Ile Ala	Asn Ser	Val		
1025			1030		1035				
Lys Gly	Glu Glu	Glu Ile	Pro Asp	Gly Thr	Val Ala	Val Leu	Thr		
1040			1045		1050				
Pro Asp	Met Pro	Asp Val	Leu Ser	His Val	Ser Val	Arg Ala	Arg		
1055			1060		1065				
Asn Ser	Lys Val	Cys Phe	Ala Thr	Cys Phe	Asp Pro	Asn Ile	Leu		
1070			1075		1080				
Ala Asn	Leu Gln	Glu Tyr	Lys Gly	Lys Leu	Leu Arg	Leu Lys	Pro		
1085			1090		1095				
Thr Ser	Ala Asp	Val Val	Tyr Ser	Glu Val	Lys Glu	Gly Glu	Phe		
1100			1105		1110				
Ile Asp	Asp Lys	Ser Thr	Gln Leu	Lys Asp	Val Gly	Ser Val	Ser		
1115			1120		1125				
Pro Ile	Ser Leu	Ala Arg	Lys Lys	Phe Ser	Gly Arg	Tyr Ala	Val		
1130			1135		1140				
Ser Ser	Glu Glu	Phe Thr	Gly Glu	Met Val	Gly Ala	Lys Ser	Arg		
1145			1150		1155				
Asn Ile	Ser Tyr	Leu Lys	Gly Lys	Val Ala	Ser Trp	Ile Gly	Ile		
1160			1165		1170				
Pro Thr	Ser Val	Ala Ile	Pro Phe	Gly Val	Phe Glu	His Val	Leu		
1175			1180		1185				
Ser Asp	Lys Pro	Asn Gln	Ala Val	Ala Glu	Arg Val	Asn Asn	Leu		
1190			1195		1200				
Lys Lys	Lys Leu	Thr Glu	Gly Asp	Phe Ser	Val Leu	Lys Glu	Ile		
1205			1210		1215				
Arg Glu	Thr Val	Leu Gln	Leu Asn	Ala Pro	Ser Gln	Leu Val	Glu		

1220	1225	1230
Glu Leu Lys Thr Lys Met Lys Ser Ser Gly Met Pro Trp Pro Gly		
1235	1240	1245
Asp Glu Gly Glu Gln Arg Trp Glu Gln Ala Trp Ile Ala Ile Lys		
1250	1255	1260
Lys Val Trp Gly Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser Thr		
1265	1270	1275
Arg Lys Val Lys Leu Asp His Glu Tyr Leu Ser Met Ala Val Leu		
1280	1285	1290
Val Gln Glu Val Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr		
1295	1300	1305
Thr Asn Pro Ala Ser Gly Asp Ser Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val		
1310	1315	1320
Val Lys Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg		
1325	1330	1335
Ala Leu Ser Phe Ile Cys Lys Lys Arg Asp Leu Asn Ser Pro Gln		
1340	1345	1350
Val Leu Gly Tyr Pro Ser Lys Pro Val Gly Leu Phe Ile Arg Gln		
1355	1360	1365
Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly		
1370	1375	1380
Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Ala		
1385	1390	1395
Glu Lys Val Val Leu Asp Tyr Ser Ser Asp Lys Leu Ile Leu Asp		
1400	1405	1410
Gly Ser Phe Arg Gln Ser Ile Leu Ser Ser Ile Ala Arg Ala Gly		
1415	1420	1425
Asn Glu Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Thr Pro Gln Asp Ile Glu Gly		
1430	1435	1440

Val Ile Lys Asp Gly Lys Val Tyr Val Val Gln Thr Arg Pro Gln
 1445 1450 1455

Met

<210> 16
 <211> 4846
 <212> DNA
 <213> Zea mays

<220>
 <221> CDS
 <222> (158)..(4567)
 <223>

<300>
 <308> NCBI / AR400813
 <309> 2003-12-18

<400> 16
 ccacgcgtcc ggcttcatct tgetgatcgt gtcctgggct tcttgatact ccgtgactgt 60
 ctccgtccga agcgagttag caagccgacc aacagcggct gagattcgct gcaacgtcgg 120
 tatcaaaagg tgtccgagcg gttgagattc gcgtgcc atg tcc gga ttc agt gcc 175
 Met Ser Gly Phe Ser Ala
 1 5
 gcg gcc aac gca gcg gcg gct gag cgg tgc gcg ctc gcg ttc cgc gca 223
 Ala Ala Asn Ala Ala Ala Ala Glu Arg Cys Ala Leu Ala Phe Arg Ala
 10 15 20
 cgg ccc gcg gcc tcc tcg cca gcg aag cgg cag cag cag ccg cag cca 271
 Arg Pro Ala Ala Ser Ser Pro Ala Lys Arg Gln Gln Gln Pro Gln Pro
 25 30 35
 gcg tcc ctc cga cgc agc ggg ggc cag cgc cgc ccc acg acg ctc tcc 319
 Ala Ser Leu Arg Arg Ser Gly Gly Gln Arg Arg Pro Thr Thr Leu Ser
 40 45 50
 gcc tct agc cgc ggc ccc gtc gtg ccg cgc gcc gtc gcc acg tcc gcg 367
 Ala Ser Ser Arg Gly Pro Val Val Pro Arg Ala Val Ala Thr Ser Ala
 55 60 65 70
 gac cgc gcg tcc ccc gac ctt atc gga aag ttc acg ctg gat tcc aac 415
 Asp Arg Ala Ser Pro Asp Leu Ile Gly Lys Phe Thr Leu Asp Ser Asn
 75 80 85
 tcc gag ctc cag gtc gca gtg aac cca gcg ccg cag ggt ttg gtg tca 463
 Ser Glu Leu Gln Val Ala Val Asn Pro Ala Pro Gln Gly Leu Val Ser
 90 95 100

gag att agc ctg gag gtg acc aac aca agc ggt tcc ctg att ttg cat	511
Glu Ile Ser Leu Glu Val Thr Asn Thr Ser Gly Ser Leu Ile Leu His	
105 110 115	
tgg gga gcc ctt cgc ccg gac aag aga gat tgg atc ctc ccg tcc aga	559
Trp Gly Ala Leu Arg Pro Asp Lys Arg Asp Trp Ile Leu Pro Ser Arg	
120 125 130	
aaa cct gat gga acg aca gtg tac aag aac agg gct ctc agg aca cct	607
Lys Pro Asp Gly Thr Val Tyr Lys Asn Arg Ala Leu Arg Thr Pro	
135 140 145 150	
ttt gta aag tca ggt gat aac tcc act cta agg att gag ata gat gat	655
Phe Val Lys Ser Gly Asp Asn Ser Thr Leu Arg Ile Glu Ile Asp Asp	
155 160 165	
cct ggg gtg cac gcc att gag ttc ctc atc ttt gac gag aca cag aac	703
Pro Gly Val His Ala Ile Glu Phe Leu Ile Phe Asp Glu Thr Gln Asn	
170 175 180	
aaa tgg ttt aaa aac aat ggc cag aat ttt cag gtt cag ttc cag tcg	751
Lys Trp Phe Lys Asn Asn Gly Gln Asn Phe Gln Val Gln Phe Gln Ser	
185 190 195	
agc cgc cat cag ggt act ggt gca tct ggt gcc tcc tct tct gct act	799
Ser Arg His Gln Gly Thr Gly Ala Ser Gly Ala Ser Ser Ser Ala Thr	
200 205 210	
tct acc ttg gtg cca gag gat ctt gtg cag atc caa gct tac ctt cgg	847
Ser Thr Leu Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Ile Gln Ala Tyr Leu Arg	
215 220 225 230	
tgg gaa aga agg gga aag cag tca tac aca cca gag caa gaa aag gag	895
Trp Glu Arg Arg Gly Lys Gln Ser Tyr Thr Pro Glu Gln Glu Lys Glu	
235 240 245	
gag tat gaa gct gca cga gct gag tta ata gag gaa gta aac aga ggt	943
Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Ala Glu Leu Ile Glu Glu Val Asn Arg Gly	
250 255 260	
gtt tct tta gag aag ctt cga gct aaa ttg aca aaa gca cct gaa gca	991
Val Ser Leu Glu Lys Leu Arg Ala Lys Leu Thr Lys Ala Pro Glu Ala	
265 270 275	
cct gag tcg gat gaa agt aaa tct tct gca tct cga atg ccc atc ggt	1039
Pro Glu Ser Asp Glu Ser Lys Ser Ser Ala Ser Arg Met Pro Ile Gly	
280 285 290	
aaa ctt cca gag gat ctt gta cag gtg cag gct tat ata agg tgg gag	1087
Lys Leu Pro Glu Asp Leu Val Gln Val Gln Ala Tyr Ile Arg Trp Glu	
295 300 305 310	
caa gcg ggc aag cca aac tat cct cct gag aag caa ctg gta gaa ttt	1135
Gln Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Gln Leu Val Glu Phe	
315 320 325	

gag gaa gca agg aag gaa ctg cag gct gag gtg gac aag gga atc tct Glu Glu Ala Arg Lys Glu Leu Gln Ala Glu Val Asp Lys Gly Ile Ser 330 335 340	1183
att gat cag ttg agg cag aaa att ttg aaa gga aac att gag agt aaa Ile Asp Gln Leu Arg Gln Lys Ile Leu Lys Gly Asn Ile Glu Ser Lys 345 350 355	1231
gtt tcc aag cag ctg aag aac aag aag tac ttc tct gta gaa agg att Val Ser Lys Gln Leu Lys Asn Lys Lys Tyr Phe Ser Val Glu Arg Ile 360 365 370	1279
cag cgc aaa aag aga gat atc aca caa ctt ctc agt aaa cat aag cat Gln Arg Lys Lys Arg Asp Ile Thr Gln Leu Leu Ser Lys His Lys His 375 380 385 390	1327
aca ctt gtg gaa gat aaa gta gag gtt gta cca aaa caa cca act gtt Thr Leu Val Glu Asp Lys Val Glu Val Val Pro Lys Gln Pro Thr Val 395 400 405	1375
ctt gat ctc ttc acc aag tct tta cat gag aag gat ggc tgt gaa gtt Leu Asp Leu Phe Thr Lys Ser Leu His Glu Lys Asp Gly Cys Glu Val 410 415 420	1423
cta agc aga aag ctc ttc aag ttc ggc gat aaa gag ata ctg gca att Leu Ser Arg Lys Leu Phe Lys Phe Gly Asp Lys Glu Ile Leu Ala Ile 425 430 435	1471
tct acc aag gtt caa aat aaa aca gaa gtt cac ttg gca aca aac cat Ser Thr Lys Val Gln Asn Lys Thr Glu Val His Leu Ala Thr Asn His 440 445 450	1519
acc gac cca ctt att ctt cac tgg tct ttg gca aaa aat gct gga gaa Thr Asp Pro Leu Ile Leu His Trp Ser Leu Ala Lys Asn Ala Gly Glu 455 460 465 470	1567
tgg aag gca cct tct cca aat ata ttg cca tct ggt tcc aca ttg ctg Trp Lys Ala Pro Ser Pro Asn Ile Leu Pro Ser Gly Ser Thr Leu Leu 475 480 485	1615
gac aag gcg tgt gaa act gaa ttt act aaa tct gaa ttg gat ggt ttg Asp Lys Ala Cys Glu Thr Glu Phe Thr Lys Ser Glu Leu Asp Gly Leu 490 495 500	1663
cat tac cag gtt gtt gag ata gag ctt gat gat gga gga tac aaa gga His Tyr Gln Val Val Glu Ile Glu Leu Asp Asp Gly Gly Tyr Lys Gly 505 510 515	1711
atg cca ttt gtt ctt cgg tct ggt gaa aca tgg aaa aaa aat aat ggt Met Pro Phe Val Leu Arg Ser Gly Glu Thr Trp Lys Lys Asn Asn Gly 520 525 530	1759
tct gat ttt ttc cta gat ttc agc acc cat gat gtc aga aat att aag Ser Asp Phe Phe Leu Asp Phe Ser Thr His Asp Val Arg Asn Ile Lys 535 540 545 550	1807
tta aag ggc aat ggt gat gct ggt aaa ggt act gct aag gca ttg ctg	1855

Leu Lys Gly Asn Gly Asp Ala Gly Lys Gly Thr Ala Lys Ala Leu Leu	
555 560 565	
gag aga ata gca gat ctg gag gaa gat gcc cag cga tct ctt atg cac	1903
Glu Arg Ile Ala Asp Leu Glu Glu Asp Ala Gln Arg Ser Leu Met His	
570 575 580	
aga ttc aat att gca gca gat cta gct gac caa gcc aga gat gct gga	1951
Arg Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Ala Asp Gln Ala Arg Asp Ala Gly	
585 590 595	
ctt ttg ggt att gtt ggg ctt ttt gtt tgg att aga ttc atg gct acc	1999
Leu Leu Gly Ile Val Gly Leu Phe Val Trp Ile Arg Phe Met Ala Thr	
600 605 610	
agg caa cta aca tgg aat aag aac tat aat gtg aag cca cgt gag ata	2047
Arg Gln Leu Thr Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile	
615 620 625 630	
agc aaa gca cag gat agg ttt aca gat gat ctt gag aat atg tac aaa	2095
Ser Lys Ala Gln Asp Arg Phe Thr Asp Asp Leu Glu Asn Met Tyr Lys	
635 640 645	
gct tat cca cag tac aga gag ata tta aga atg ata atg gct gct gtt	2143
Ala Tyr Pro Gln Tyr Arg Glu Ile Leu Arg Met Ile Met Ala Ala Val	
650 655 660	
ggg cgc gga ggt gaa ggt gat gtt ggt caa cgc att cgt gat gag ata	2191
Gly Arg Gly Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile	
665 670 675	
tta gta ata cag aga aat aat gac tgc aaa ggt gga atg atg gaa gaa	2239
Leu Val Ile Gln Arg Asn Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met Met Glu Glu	
680 685 690	
tgg cac cag aaa ttg cac aac aat aca agc cca gat gat gta gtg ata	2287
Trp His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val Val Ile	
695 700 705 710	
tgc cag gcc tta att gat tat atc aag agt gac ttt gat ata agc gtt	2335
Cys Gln Ala Leu Ile Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Ile Ser Val	
715 720 725	
tac tgg gac acc ttg aac aaa aat ggc ata acc aaa gag cgt ctc ttg	2383
Tyr Trp Asp Thr Leu Asn Lys Asn Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu	
730 735 740	
agc tat gat cgt gct att cat tca gaa cca aat ttc aga agt gaa cag	2431
Ser Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Ser Glu Gln	
745 750 755	
aag gcg ggt tta ctc cgt gac ctg gga aat tac atg aga agc cta aag	2479
Lys Ala Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly Asn Tyr Met Arg Ser Leu Lys	
760 765 770	
gct gtg cat tct ggt gct gat ctt gaa tct gct ata gca agt tgt atg	2527
Ala Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ala Ser Cys Met	

775	780	785	790	
gga tac aaa tca gag ggt gaa ggt ttc atg gtt ggt gtt cag atc aat				2575
Gly Tyr Lys Ser Glu Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val Gln Ile Asn				
795		800	805	
cca gtg aag ggt tta cca tct gga ttt ccg gag ttg ctt gaa ttt gtg				2623
Pro Val Lys Gly Leu Pro Ser Gly Phe Pro Glu Leu Leu Glu Phe Val				
810		815	820	
ctt gaa cat gtt gag gat aaa tca gcg gaa cca ctt ctt gag ggg cta				2671
Leu Glu His Val Glu Asp Lys Ser Ala Glu Pro Leu Leu Glu Gly Leu				
825		830	835	
ttg gaa gct cga gtt gaa ctg cgc cct ttg ctt ctt gat tcg cgt gaa				2719
Leu Glu Ala Arg Val Glu Leu Arg Pro Leu Leu Leu Asp Ser Arg Glu				
840		845	850	
cgc atg aaa gat ctt ata ttt ttg gac att gct ctt gat tct acc ttc				2767
Arg Met Lys Asp Leu Ile Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp Ser Thr Phe				
855		860	865	870
agg aca gca att gaa agg tca tat gag gag ctg aat gat gca gcc cca				2815
Arg Thr Ala Ile Glu Arg Ser Tyr Glu Glu Leu Asn Asp Ala Ala Pro				
875		880	885	
gag aaa ata atg tac ttc atc agt ctt gtc ctt gaa aat ctt gcg ctt				2863
Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu				
890		895	900	
tca att gac gac aat gaa gac atc ctg tat tgt tta aag gga tgg aac				2911
Ser Ile Asp Asp Asn Glu Asp Ile Leu Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asn				
905		910	915	
caa gcc ttg gaa atg gct aag caa aaa gac gac caa tgg gcg ctc tat				2959
Gln Ala Leu Glu Met Ala Lys Gln Lys Asp Asp Gln Trp Ala Leu Tyr				
920		925	930	
gct aaa gca ttt ctt gac aga aac aga ctt gcc ctt gcg agc aag gga				3007
Ala Lys Ala Phe Leu Asp Arg Asn Arg Leu Ala Leu Ala Ser Lys Gly				
935		940	945	950
gaa caa tac cat aat atg atg cag ccc tct gct gag tat ctt ggc tcg				3055
Glu Gln Tyr His Asn Met Met Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser				
955		960	965	
tta ctc agc ata gac caa tgg gca gtc aat atc ttc aca gaa gaa att				3103
Leu Leu Ser Ile Asp Gln Trp Ala Val Asn Ile Phe Thr Glu Glu Ile				
970		975	980	
ata cgc ggt gga tca gct gct act ctg tct gct ctt ctg aac cga ttt				3151
Ile Arg Gly Gly Ser Ala Ala Thr Leu Ser Ala Leu Leu Asn Arg Phe				
985		990	995	
gat cct gtt tta agg aat gtt gct cac ctc gga agt tgg cag gtt				3196
Asp Pro Val Leu Arg Asn Val Ala His Leu Gly Ser Trp Gln Val				
1000		1005	1010	

ata agc ccg gtt gaa gta tca ggt tat gtg gtt gtg gtt gat gag Ile Ser Pro Val Glu Val Ser Gly Tyr Val Val Val Val Asp Glu 1015 1020 1025	3241
tta ctt gct gtc cag aac aaa tct tat gat aaa cca acc atc ctt Leu Leu Ala Val Gln Asn Lys Ser Tyr Asp Lys Pro Thr Ile Leu 1030 1035 1040	3286
gtg gca aag agt gtc aag gga gag gaa gaa ata cca gat gga gta Val Ala Lys Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Val 1045 1050 1055	3331
gtt ggt gta att aca cct gat atg cca gat gtt ctg tct cat gtg Val Gly Val Ile Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val 1060 1065 1070	3376
tca gtc cga gca agg aat agc aag gta ctg ttt gcg acc tgt ttt Ser Val Arg Ala Arg Asn Ser Lys Val Leu Phe Ala Thr Cys Phe 1075 1080 1085	3421
gac cac acc act cta tct gaa ctt gaa gga tat gat cag aaa ctg Asp His Thr Thr Leu Ser Glu Leu Glu Gly Tyr Asp Gln Lys Leu 1090 1095 1100	3466
ttt tcc ttc aag cct act tct gca gat ata acc tat agg gag atc Phe Ser Phe Lys Pro Thr Ser Ala Asp Ile Thr Tyr Arg Glu Ile 1105 1110 1115	3511
aca gag agt gaa ctt cag caa tca agt tct cca aat gca gaa gtt Thr Glu Ser Glu Leu Gln Gln Ser Ser Ser Pro Asn Ala Glu Val 1120 1125 1130	3556
ggc cat gca gta cca tct att tca ttg gcc aag aag aaa ttt ctt Gly His Ala Val Pro Ser Ile Ser Leu Ala Lys Lys Lys Phe Leu 1135 1140 1145	3601
gga aaa tat gca ata tca gcc gaa gaa ttc tct gag gaa atg gtt Gly Lys Tyr Ala Ile Ser Ala Glu Glu Phe Ser Glu Glu Met Val 1150 1155 1160	3646
ggg gcc aag tct cgg aat ata gca tac ctc aaa gga aaa gta cct Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu Lys Gly Lys Val Pro 1165 1170 1175	3691
tca tgg gtc ggt gtc cca acg tca gtt gcg ata cca ttt ggc act Ser Trp Val Gly Val Pro Thr Ser Val Ala Ile Pro Phe Gly Thr 1180 1185 1190	3736
ttt gag aag gtt ttg tca gat ggg ctt aat aag gaa gta gca cag Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp Gly Leu Asn Lys Glu Val Ala Gln 1195 1200 1205	3781
agc ata gag aag ctt aag atc aga ctt gcc caa gaa gat ttt agt Ser Ile Glu Lys Leu Lys Ile Arg Leu Ala Gln Glu Asp Phe Ser 1210 1215 1220	3826

gct cta ggt gaa ata aga aaa gtc gtc ctt aat ctt act gct cct	3871
Ala Leu Gly Glu Ile Arg Lys Val Val Leu Asn Leu Thr Ala Pro	
1225 1230 1235	
atg caa ttg gtt aat gag ctg aag gag agg atg cta ggc tct gga	3916
Met Gln Leu Val Asn Glu Leu Lys Glu Arg Met Leu Gly Ser Gly	
1240 1245 1250	
atg ccc tgg cct ggt gat gaa gga gac aag cgt tgg gag caa gca	3961
Met Pro Trp Pro Gly Asp Glu Gly Asp Lys Arg Trp Glu Gln Ala	
1255 1260 1265	
tgg atg gct att aaa aag gtt tgg gca tca aaa tgg aac gaa aga	4006
Trp Met Ala Ile Lys Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg	
1270 1275 1280	
gca tat ttt agc aca cgc aag gtg aaa ctt gat cat gag tac ctt	4051
Ala Tyr Phe Ser Thr Arg Lys Val Lys Leu Asp His Glu Tyr Leu	
1285 1290 1295	
tcg atg gct gtt ctc gtg caa gaa gtt gtg aat gca gat tat gct	4096
Ser Met Ala Val Leu Val Gln Glu Val Val Asn Ala Asp Tyr Ala	
1300 1305 1310	
ttt gtc att cat acc aca aac cca tcg tct gga gat tct tct gag	4141
Phe Val Ile His Thr Thr Asn Pro Ser Ser Gly Asp Ser Ser Glu	
1315 1320 1325	
ata tat gct gaa gtg gtg aaa ggg ctt ggc gag acc ctc gtg gga	4186
Ile Tyr Ala Glu Val Val Lys Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly	
1330 1335 1340	
gcc tat cct ggt cgt gct atg agc ttt gtt tgc aaa aaa gat gac	4231
Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Met Ser Phe Val Cys Lys Lys Asp Asp	
1345 1350 1355	
ctt gac tct ccc aag tta ctt ggt tac cca agc aag cca att ggt	4276
Leu Asp Ser Pro Lys Leu Leu Gly Tyr Pro Ser Lys Pro Ile Gly	
1360 1365 1370	
ctc ttc ata agg caa tca atc atc ttc cgt tcc gac tcc aac ggt	4321
Leu Phe Ile Arg Gln Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly	
1375 1380 1385	
gag gac ctg gaa ggt tat gct gga gca gga tta tat gat agt gta	4366
Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Val	
1390 1395 1400	
ccg atg gat gag gag gat gag gtt gta ctt gat tat aca act gac	4411
Pro Met Asp Glu Glu Asp Glu Val Val Leu Asp Tyr Thr Thr Asp	
1405 1410 1415	
cct ctt ata gta gac cgt gga ttc cga agc tca atc ctc tca agc	4456
Pro Leu Ile Val Asp Arg Gly Phe Arg Ser Ser Ile Leu Ser Ser	
1420 1425 1430	
ata gca cgg gct ggc cat gcc atc gag gag cta tat ggt tct cct	4501

Ile Ala Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser Pro
 1435 1440 1445
 cag gac gtc gag gga gta gtg aag gat gga aaa atc tat gta gtc 4546
 Gln Asp Val Glu Gly Val Val Lys Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val
 1450 1455 1460
 cag aca aga cca cag atg tag tatgtatgca tctattagac agctcaataa 4597
 Gln Thr Arg Pro Gln Met
 1465
 gcactgttgt acgcttgtat ggttgggaca tatgggcgtt atggcatgta tagttgtatg 4657
 cctagatgta caacacgtgt actcgtatat atatataaa atgctgaaac aagcattggt 4717
 cctgtactgt agtttctaca ttccattgtc accaataatt aagtgtactc ctatggctgg 4777
 gagtctatga aaatggacgt gttgacttat tgggtaataa ataatttata taaaaaaaaa 4837
 aaaaaaaag 4846

 <210> 17
 <211> 1469
 <212> PRT
 <213> Zea mays

 <400> 17

 Met Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Asn Ala Ala Ala Ala Glu Arg Cys
 1 5 10 15

 Ala Leu Ala Phe Arg Ala Arg Pro Ala Ala Ser Ser Pro Ala Lys Arg
 20 25 30

 Gln Gln Gln Pro Gln Pro Ala Ser Leu Arg Arg Ser Gly Gly Gln Arg
 35 40 45

 Arg Pro Thr Thr Leu Ser Ala Ser Ser Arg Gly Pro Val Val Pro Arg
 50 55 60

 Ala Val Ala Thr Ser Ala Asp Arg Ala Ser Pro Asp Leu Ile Gly Lys
 65 70 75 80

 Phe Thr Leu Asp Ser Asn Ser Glu Leu Gln Val Ala Val Asn Pro Ala
 85 90 95

 Pro Gln Gly Leu Val Ser Glu Ile Ser Leu Glu Val Thr Asn Thr Ser
 100 105 110

Gly Ser Leu Ile Leu His Trp Gly Ala Leu Arg Pro Asp Lys Arg Asp
115 120 125

Trp Ile Leu Pro Ser Arg Lys Pro Asp Gly Thr Thr Val Tyr Lys Asn
130 135 140

Arg Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Lys Ser Gly Asp Asn Ser Thr Leu
145 150 155 160

Arg Ile Glu Ile Asp Asp Pro Gly Val His Ala Ile Glu Phe Leu Ile
165 170 175

Phe Asp Glu Thr Gln Asn Lys Trp Phe Lys Asn Asn Gly Gln Asn Phe
180 185 190

Gln Val Gln Phe Gln Ser Ser Arg His Gln Gly Thr Gly Ala Ser Gly
195 200 205

Ala Ser Ser Ser Ala Thr Ser Thr Leu Val Pro Glu Asp Leu Val Gln
210 215 220

Ile Gln Ala Tyr Leu Arg Trp Glu Arg Arg Gly Lys Gln Ser Tyr Thr
225 230 235 240

Pro Glu Gln Glu Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Ala Glu Leu Ile
245 250 255

Glu Glu Val Asn Arg Gly Val Ser Leu Glu Lys Leu Arg Ala Lys Leu
260 265 270

Thr Lys Ala Pro Glu Ala Pro Glu Ser Asp Glu Ser Lys Ser Ser Ala
275 280 285

Ser Arg Met Pro Ile Gly Lys Leu Pro Glu Asp Leu Val Gln Val Gln
290 295 300

Ala Tyr Ile Arg Trp Glu Gln Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Pro Pro Glu
305 310 315 320

Lys Gln Leu Val Glu Phe Glu Glu Ala Arg Lys Glu Leu Gln Ala Glu
325 330 335

Val Asp Lys Gly Ile Ser Ile Asp Gln Leu Arg Gln Lys Ile Leu Lys

340	345	350
Gly Asn Ile Glu Ser Lys Val Ser Lys Gln Leu Lys Asn Lys Lys Tyr		
355	360	365
Phe Ser Val Glu Arg Ile Gln Arg Lys Lys Arg Asp Ile Thr Gln Leu		
370	375	380
Leu Ser Lys His Lys His Thr Leu Val Glu Asp Lys Val Glu Val Val		
385	390	395 400
Pro Lys Gln Pro Thr Val Leu Asp Leu Phe Thr Lys Ser Leu His Glu		
	405	410 415
Lys Asp Gly Cys Glu Val Leu Ser Arg Lys Leu Phe Lys Phe Gly Asp		
	420	425 430
Lys Glu Ile Leu Ala Ile Ser Thr Lys Val Gln Asn Lys Thr Glu Val		
	435	440 445
His Leu Ala Thr Asn His Thr Asp Pro Leu Ile Leu His Trp Ser Leu		
	450	455 460
Ala Lys Asn Ala Gly Glu Trp Lys Ala Pro Ser Pro Asn Ile Leu Pro		
465	470	475 480
Ser Gly Ser Thr Leu Leu Asp Lys Ala Cys Glu Thr Glu Phe Thr Lys		
	485	490 495
Ser Glu Leu Asp Gly Leu His Tyr Gln Val Val Glu Ile Glu Leu Asp		
	500	505 510
Asp Gly Gly Tyr Lys Gly Met Pro Phe Val Leu Arg Ser Gly Glu Thr		
	515	520 525
Trp Lys Lys Asn Asn Gly Ser Asp Phe Phe Leu Asp Phe Ser Thr His		
	530	535 540
Asp Val Arg Asn Ile Lys Leu Lys Gly Asn Gly Asp Ala Gly Lys Gly		
545	550	555 560
Thr Ala Lys Ala Leu Leu Glu Arg Ile Ala Asp Leu Glu Glu Asp Ala		
	565	570 575

Gln Arg Ser Leu Met His Arg Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Ala Asp
580 585 590

Gln Ala Arg Asp Ala Gly Leu Leu Gly Ile Val Gly Leu Phe Val Trp
595 600 605

Ile Arg Phe Met Ala Thr Arg Gln Leu Thr Trp Asn Lys Asn Tyr Asn
610 615 620

Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp Arg Phe Thr Asp Asp
625 630 635 640

Leu Glu Asn Met Tyr Lys Ala Tyr Pro Gln Tyr Arg Glu Ile Leu Arg
645 650 655

Met Ile Met Ala Ala Val Gly Arg Gly Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln
660 665 670

Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg Asn Asn Asp Cys Lys
675 680 685

Gly Gly Met Met Glu Glu Trp His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser
690 695 700

Pro Asp Asp Val Val Ile Cys Gln Ala Leu Ile Asp Tyr Ile Lys Ser
705 710 715 720

Asp Phe Asp Ile Ser Val Tyr Trp Asp Thr Leu Asn Lys Asn Gly Ile
725 730 735

Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro
740 745 750

Asn Phe Arg Ser Glu Gln Lys Ala Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly Asn
755 760 765

Tyr Met Arg Ser Leu Lys Ala Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser
770 775 780

Ala Ile Ala Ser Cys Met Gly Tyr Lys Ser Glu Gly Glu Gly Phe Met
785 790 795 800

Val Gly Val Gln Ile Asn Pro Val Lys Gly Leu Pro Ser Gly Phe Pro
805 810 815

Glu Leu Leu Glu Phe Val Leu Glu His Val Glu Asp Lys Ser Ala Glu
820 825 830

Pro Leu Leu Glu Gly Leu Leu Glu Ala Arg Val Glu Leu Arg Pro Leu
835 840 845

Leu Leu Asp Ser Arg Glu Arg Met Lys Asp Leu Ile Phe Leu Asp Ile
850 855 860

Ala Leu Asp Ser Thr Phe Arg Thr Ala Ile Glu Arg Ser Tyr Glu Glu
865 870 875 880

Leu Asn Asp Ala Ala Pro Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val
885 890 895

Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser Ile Asp Asp Asn Glu Asp Ile Leu Tyr
900 905 910

Cys Leu Lys Gly Trp Asn Gln Ala Leu Glu Met Ala Lys Gln Lys Asp
915 920 925

Asp Gln Trp Ala Leu Tyr Ala Lys Ala Phe Leu Asp Arg Asn Arg Leu
930 935 940

Ala Leu Ala Ser Lys Gly Glu Gln Tyr His Asn Met Met Gln Pro Ser
945 950 955 960

Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Leu Leu Ser Ile Asp Gln Trp Ala Val Asn
965 970 975

Ile Phe Thr Glu Glu Ile Ile Arg Gly Gly Ser Ala Ala Thr Leu Ser
980 985 990

Ala Leu Leu Asn Arg Phe Asp Pro Val Leu Arg Asn Val Ala His Leu
995 1000 1005

Gly Ser Trp Gln Val Ile Ser Pro Val Glu Val Ser Gly Tyr Val
1010 1015 1020

Val Val Val Asp Glu Leu Leu Ala Val Gln Asn Lys Ser Tyr Asp
1025 1030 1035

Lys Pro Thr Ile Leu Val Ala Lys Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu
1040 1045 1050

Ile Pro Asp Gly Val Val Gly Val Ile Thr Pro Asp Met Pro Asp
1055 1060 1065

Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala Arg Asn Ser Lys Val Leu
1070 1075 1080

Phe Ala Thr Cys Phe Asp His Thr Thr Leu Ser Glu Leu Glu Gly
1085 1090 1095

Tyr Asp Gln Lys Leu Phe Ser Phe Lys Pro Thr Ser Ala Asp Ile
1100 1105 1110

Thr Tyr Arg Glu Ile Thr Glu Ser Glu Leu Gln Gln Ser Ser Ser
1115 1120 1125

Pro Asn Ala Glu Val Gly His Ala Val Pro Ser Ile Ser Leu Ala
1130 1135 1140

Lys Lys Lys Phe Leu Gly Lys Tyr Ala Ile Ser Ala Glu Glu Phe
1145 1150 1155

Ser Glu Glu Met Val Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu
1160 1165 1170

Lys Gly Lys Val Pro Ser Trp Val Gly Val Pro Thr Ser Val Ala
1175 1180 1185

Ile Pro Phe Gly Thr Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp Gly Leu Asn
1190 1195 1200

Lys Glu Val Ala Gln Ser Ile Glu Lys Leu Lys Ile Arg Leu Ala
1205 1210 1215

Gln Glu Asp Phe Ser Ala Leu Gly Glu Ile Arg Lys Val Val Leu
1220 1225 1230

Asn Leu Thr Ala Pro Met Gln Leu Val Asn Glu Leu Lys Glu Arg

1235	1240	1245
Met Leu Gly Ser Gly Met Pro Trp Pro Gly Asp Glu Gly Asp Lys 1250 1255 1260		
Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala Ile Lys Lys Val Trp Ala Ser 1265 1270 1275		
Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser Thr Arg Lys Val Lys Leu 1280 1285 1290		
Asp His Glu Tyr Leu Ser Met Ala Val Leu Val Gln Glu Val Val 1295 1300 1305		
Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr Thr Asn Pro Ser Ser 1310 1315 1320		
Gly Asp Ser Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val Val Lys Gly Leu Gly 1325 1330 1335		
Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Met Ser Phe Val 1340 1345 1350		
Cys Lys Lys Asp Asp Leu Asp Ser Pro Lys Leu Leu Gly Tyr Pro 1355 1360 1365		
Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Arg Gln Ser Ile Ile Phe Arg 1370 1375 1380		
Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Gly 1385 1390 1395		
Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Glu Asp Glu Val Val Leu 1400 1405 1410		
Asp Tyr Thr Thr Asp Pro Leu Ile Val Asp Arg Gly Phe Arg Ser 1415 1420 1425		
Ser Ile Leu Ser Ser Ile Ala Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu 1430 1435 1440		
Leu Tyr Gly Ser Pro Gln Asp Val Glu Gly Val Val Lys Asp Gly 1445 1450 1455		

Lys Ile Tyr Val Val Gln Thr Arg Pro Gln Met
1460 1465